

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**Incorporación Heterotrófica de Leucina por *Arquea* en la
Columna de Agua de la Plataforma Continental de
Concepción**

POR
HECTOR ARMANDO LEVIPAN COLIL

TESIS DE MAGISTER PRESENTADA A
LA ESCUELA DE GRADUADOS DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGIA

CONCEPCION-CHILE

2006

RESUMEN

Incorporación Heterotrófica de Leucina por Arquea en la Columna de Agua de la Plataforma

Continental de Concepción

Por

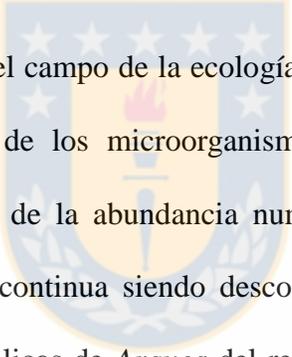
Héctor Armando Levipan Colil

Candidato a Magíster en Ciencias con Mención en Microbiología

Universidad de Concepción, 2006

Dr. Renato Quiñones B., Director de Tesis

Dr. Homero Urrutia B., Codirector de Tesis



Los últimos avances en el campo de la ecología microbiana han revelado que las arqueas planctónicas representan unos de los microorganismos unicelulares más abundantes de los océanos. Sin embargo, a pesar de la abundancia numérica de este grupo en los ecosistemas marinos su rol biogeoquímico continua siendo desconocido. La imposibilidad, a la fecha, de discriminar los procesos metabólicos de *Arquea* del resto de los microorganismos *in situ* dentro de una comunidad procarionte ha dificultado la estimación de procesos clave tales como la producción secundaria de *Arquea* (PSA). Por lo tanto, el objetivo central de esta Tesis fue estimar la importancia de las arqueas heterótrofas planctónicas en el ciclo del carbono frente a la zona centro-sur de Chile, con énfasis en la estimación empírica de la PSA y en el flujo potencial de carbono mediante la vía metanogénica. Muestras de agua de mar de diferentes profundidades fueron obtenidas directamente desde el área de estudio (*i.e.*, 36°30' S – 73°07' W and 36°20' S – 73°44' W) y destinadas a diferentes tipos de análisis: (1) caracterización de variables físico-químicas de la columna de agua, (2) cuantificación de la abundancia celular procarionte y análisis de la composición taxonómica en la columna de agua mediante hibridación por dot blot

cuantitativo de ARNr, (3) determinación de la producción procarionte total (PPT) y la PSA en la zona de mínimo de oxígeno (ZMO, profundidad = 80 m) mediante el uso del inhibidor de la hipusinación N^1 -guanil-1,7-diaminoheptano (GC_7) e incorporación de leucina- C^{14} , (4) determinación de los principales morfotipos y biovolúmenes celulares en la ZMO mediante Microscopía Electrónica de Barrido, y (5) evaluación del potencial metanogénico (método de desplazamiento de líquido) asociado a arqueas productoras de metano (APM) presentes en la columna de agua de la ZMO a 80 metros de profundidad.

Se encontró que *Arquea* representó un grupo importante en la comunidad procarionte en la zona de estudio con aportes que oscilaron entre 6-86 % de la abundancia procarionte total. La abundancia de *Arquea* fue habitualmente mayor en la parte más profunda de la columna de agua y disminuyendo hacia la superficie, hasta valores normalmente comprendidos entre 10-40 % de la abundancia procarionte total. En la estación oceanográfica más costera y somera (E-18, 36°30' S – 73°07' O), se sugiere que los incrementos de este grupo hacia la superficie fueron principalmente debido a un efecto mecánico de transporte de estas desde el fondo y desde la capa de agua sub-óxica inmediatamente adyacente a este con origen en las AEES (*i.e.*, sedimento más 'Benthic Boundary Layer' [BBL]), haciendo menos probable un aumento de la población de arqueas *in situ* en la columna de agua superficial producto de la actividad metabólica. Este transporte ocurrió mediante surgencia o mezcla turbulenta; no obstante, no se observó una asociación estricta de estos eventos a una mayor presencia de arqueas en la columna de agua ni un patrón estacional. *Crenarquea* fue el grupo arqueano dominante en la columna de agua del área de estudio. Parte de la variabilidad de arqueas totales (19 %) y crenarqueas (~18 %) podrían estar asociadas con la concentración de amonio mediante una correlación positiva, mientras que la abundancia de *Euriarquea* no fue asociada a ninguna de las variables ambientales analizadas. No obstante, un 29 % y un 26% de la variabilidad en la abundancia de metanogénicos

planctónicos fue asociada negativamente con la concentración nitrato y de temperatura, respectivamente.

Por otra parte, en esta Tesis se propone un método rápido y sencillo para estimar la PSA usando el inhibidor de la hipusinación GC₇. Este inhibe específicamente la síntesis de proteínas de arqueas de tal modo que la leucina incorporada por bacterias puede ser directamente determinada. De esta manera, la incorporación arqueana de leucina es calculada por la diferencia entre la incorporación total de leucina debida a la comunidad procarionte y la incorporación bacteriana de leucina. Previo a los experimentos en el terreno, el GC₇ fue probado como inhibidor de dos comunidades naturales de APM: (i) una comunidad enriquecida desde la ZMO (a 80 m) y (ii) otra aislada desde sedimentos de la marisma Rocuant. En ambas comunidades, la respuesta frente al fármaco fue medida por su efecto sobre la producción de metano y el recuento DAPI. Se determinó que una concentración de 200 μM de GC₇ inhibió eficientemente la metanogénesis. Además, una fuerte correlación ($r = 0.82$, $p = 0.0004$) fue encontrada entre la concentración de ARNr arqueano y las medidas de PSA obtenidas por este método. El error estándar asociado al uso del GC₇ como inhibidor fue de 8.8 %, y de acuerdo a lo esperado, este antibiótico no mostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento o la incorporación de leucina en diferentes cepas bacterianas.

De este modo, se encontró que la PSA fue parte importante de la producción secundaria mostrada por la comunidad procarionte en la ZMO llegando a representar, en determinados periodos, cerca del 97 % de la PPT. Sin embargo, la PSA osciló desde niveles no detectables hasta un máximo $\sim 300 \mu\text{g C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ sin mostrar una clara tendencia estacional. Además, las arqueas mostraron tasas de crecimiento específico comúnmente inferiores a las tasas de crecimiento bacterianas (*e.g.* $< 0.3 \text{ d}^{-1}$). Las medidas de PPT no estuvieron asociadas a las

concentraciones de ARNr determinadas para bacterias pero si para arqueas totales ($r = 0.84$, $p = 0.0001$). No obstante, cuando la comunidad procarionte era eficiente en la utilización del sustrato radiomarcado, la PPT estuvo correlacionada sólo a la concentración de ARNr bacteriano ($r = 0.79$, $p = 0.05$). Además, correlaciones significativas fueron encontradas entre la concentración de ARNr bacteriano y (a) la temperatura o (b) la clorofila-*a*. En consecuencia, los datos siguieron que: (i) *Arquea* representa una importante fracción del bacterioplancton marino en términos de abundancia en el área centro-sur de Chile, sobre todo, en la zona de mínimo de oxígeno (*i.e.* ~86 %), y (ii) también un componente importante de la producción secundaria procarionte de la ZMO, presentando importantes incrementos de actividad aunque a nivel de pulsos temporales.

También se reporta la distribución y abundancia de APM en la columna de agua, y su actividad potencial a 80 m de profundidad (ZMO). Los metanogénicos fueron detectados en el ambiente planctónico esencialmente durante periodo de surgencia activa (Primavera-verano) representando ~9 % del ARNr procarionte total en la ZMO. Se presenta evidencia de APM viables en pequeños volúmenes de agua de mar sin concentrar, y no asociados a grandes partículas de agregados orgánicos. Estas fueron capaces de producir metano utilizando sustratos no competitivos, *i.e.*, metilamina y metanol. Además, a 12 o 30 °C, la producción de metano fue completamente inhibida por adición de GC₇. La producción potencial de metano ocurriría esencialmente hacia fines de Invierno y principios de Primavera siendo la máxima producción a 12 °C igual a 0.1 pmoles CH₄ cél.⁻¹ d⁻¹. A 30 °C la producción potencial fue siempre mayor. Se encontró que la concentración de nitrato y la temperatura pueden ser importantes elementos reguladores de la abundancia de APM en el ambiente planctónico marino. Finalmente, los resultados sugieren que: (i) las APM en la columna de agua provendrían principalmente desde el sedimento, y (ii) una importante fracción de estas correspondería a variedades sicrofilicas no metilotróficas aún no cultivables.

Palabras Claves: Ciclo del carbono • Producción secundaria • Eficiencia de crecimiento procarionte • *Arquea* planctónica • Hipusinación • Hipoxia • Metanogénesis • Surgencia • Sistema de Corrientes de Humboldt

