

Caracterización molecular de las comunidades bacterianas asociadas a sedimentos de un sistema costero del norte de la corriente de Humboldt, bahía de Mejillones del Sur, Chile

Molecular characterization of bacterial communities associated to sediments in the northern Humboldt Current system, Mejillones del Sur bay, Chile

Rubén Araya^{1,2}, Juan C. Leiva³ y Jorge Valdés⁴

¹Instituto de Recursos Naturales Renovables (IA-RnR), Universidad de Antofagasta, Avda. Angamos 601, Antofagasta Chile

²Departamento de Acuicultura, Universidad de Antofagasta, Avda. Angamos 601, Antofagasta Chile

³Programa Doctorado en Ciencias Aplicadas Mención SMC, Universidad de Antofagasta, Avda. Angamos 601, Antofagasta, Chile

⁴Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad de Antofagasta, Avda. Angamos 601, Antofagasta, Chile
raraya@uantof.cl

Abstract. - To assess the structure of bacterial communities associated to coastal marine sediments of the Humboldt Current System of Mejillones bay (23°S), Chile, we examined 16S rDNA fragments of Bacteria Domain by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), along with multidimensional scaling analysis (MDS). Sediments were taken from four sampling stations located at the bay and samples from four different depth points were analyzed for three periods during one year. The genetic analysis of prokaryont communities revealed a high bacterial diversity product indicated by the high number of bands detected by DGGE. The MDS analysis showed changes among the bacterial communities in all sampling stations, particularly on the community structures of prokaryotic cells associated to sediments at 10 m, although we also found subtle differences in the structure of prokaryotic communities in all the depth analyzed. The findings of changes in the structure communities of prokaryotic cells could be triggered by changes in circulation water patterns inside the bay, which could be related to upwelling waters found at the northeast margin of the bay. In conclusion, the use of DGGE technique allowed us to establish bacterial community changes by qualitative analysis of samples obtained from different sampling stations at different periods.

Key words: DGGE, MDS, bacteria

Resumen. - Para conocer la estructura de comunidades bacterianas asociadas a sedimentos marinos del sistema costero de la corriente de Humboldt en la bahía de Mejillones del Sur (23°S), Chile, se realizaron análisis de electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) a partir de fragmentos del 16S rADN para el Dominio Bacteria, junto con el análisis de escala multidimensional (MDS). Para esto, se realizaron muestreos de sedimentos en cuatro sectores dentro de la bahía de Mejillones del Sur, durante tres períodos de muestreo y cuatro profundidades. El análisis genético de las comunidades procarióticas estudiadas reveló una alta diversidad bacteriana, la cual se estableció por el gran número de bandas detectadas por DGGE. El análisis de MDS evidenció cambios en la estructura de las comunidades asociadas a los sedimentos recolectados a 10 m, entre las 4 estaciones de muestreo. Se encontraron además, diferencias en la estructura de comunidades procarióticas asociadas a las distintas profundidades analizadas. Esta variación en la estructura genética de las comunidades procarióticas estuvo influenciada por cambios en los patrones de circulación al interior de la bahía, los cuales se asociarían al efecto de los focos de surgencia que ingresan por el margen noreste de la bahía. En conclusión, la técnica de DGGE nos permitió establecer cambios en la estructura de las comunidades bacterianas a través del análisis cualitativo de muestras obtenidas en los diferentes sectores y tiempos de muestreo.

Palabras clave: DGGE, MDS, bacteria

Introducción

La corriente de Humboldt (HCS) es uno de los sistemas marinos más ricos en productividad biológica, lo que le permite sustentar una de las mayores producciones pesqueras del planeta (Summerhayes *et al.* 1995, González *et al.* 1998, Iriarte *et al.* 2000). Esta riqueza principalmente se debe al efecto fertilizador de aguas profundas que emergen hacia la superficie conducida por los vientos, las cuales aportan nutrientes a la zona eufótica sobre el margen del continente (Barber & Smith 1981).

Esta particular característica a menudo genera ciertos cambios puntuales biológicos y oceanográficos, los cuales han sido ampliamente estudiados en los últimos años (Langue & Berger 1993, Strub *et al.* 1998, Escribano & Hidalgo 2000, Sobarzo & Figueroa 2001, Blanco *et al.* 2001). Sin embargo, estos estudios se han enfocado principalmente en los ambientes pelágicos a una escala regional, dejando en un segundo plano los sistemas marinos costeros de escala local como lo son los ambientes de bahía. En Chile, la información para estos ambientes cubre aspectos tales como circulación de masas

de agua, productividad biológica, impactos ambientales, manejo de recursos y ecología de comunidades. Sin embargo, no todas las bahías han sido estudiadas con igual intensidad, generándose vacíos de conocimiento que dificultan el entendimiento y comparación de los procesos propios de estos sistemas, así como de medidas administrativas que permitan un manejo armónico de dichos ambientes.

Uno de los aspectos menos estudiados en los ambientes costeros de Chile, es el relacionado con la estructura y dinámica de las comunidades microbiológicas que allí habitan; esto porque generalmente las bacterias han sido consideradas como una 'caja negra' dentro de los sistemas ecológicos (Kenzaka *et al.* 1998) y porque persistían deficiencias metodológicas que impedían un estudio representativo de estas comunidades de microorganismos (Wagner *et al.* 1993). Recientemente, el desarrollo de técnicas no dependientes de cultivo destinadas a evitar el bajo porcentaje de cultivabilidad (<1%) (Amann *et al.* 1995, Muyzer *et al.* 1998) respecto de la fracción total de bacterias observables en muestras ambientales (Sahm & Berninger 1998, Ellis *et al.* 2003), ha permitido conocer la variabilidad espacial y temporal de las comunidades (Ward *et al.* 1995). Además, el uso de herramientas moleculares como la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) (Muyzer *et al.* 1993), a partir de fragmentos de 16S rADN amplificados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis & Faloona 1987), ha sido utilizada junto al análisis de escala multidimensional (MDS) para analizar poblaciones bacterianas asociadas a diversos ambientes como suelos y sedimentos (Brinkhoff *et al.* 1998, Rosado *et al.* 1998, Bruns *et al.* 1999, Traian *et al.* 2008), así como bacterioplancton de ambientes lacustres y marinos (Murray *et al.* 1998, Dumestre *et al.* 2001, Schafer *et al.* 2001, Casamayor *et al.* 2002).

La península de Mejillones ha sido descrita como el accidente geográfico más importante de la costa chilena, dando origen, en la región de Antofagasta, a dos grandes bahías con aperturas opuestas como son San Jorge y Mejillones del Sur (Vargas 2002). Particularmente, esta bahía, pertenece al sistema de surgencias de Punta Angamos, descrito como el sistema de surgencias más productivo de la zona norte de Chile (Escribano 1998, González *et al.* 1998, Marín & Olivares 1999, Escribano & Hidalgo 2000, Thomas *et al.* 2001, Sobarzo & Figueroa 2001), con valores de productividad primaria que alcanzan los $1.070 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ (Marín *et al.* 1993). La circulación al interior de la bahía se caracteriza por el ingreso de aguas de surgencias por el margen noreste y por el noreste lo que genera un giro ciclónico en el centro de la bahía, con una clara estratificación térmica del agua (Escribano *et al.* 2002, Marín *et al.* 2003). Estas

características influyen fuertemente en el comportamiento estacional de la bahía, caracterizada por una estación fría y una cálida, donde los pulsos de surgencias conducen al continuo flujo de material orgánico hacia el fondo de la bahía. Sin embargo, poco se conoce respecto de cómo se comportan o influyen estacionalmente las características oceanográficas sobre las comunidades bacterianas asociadas a los sedimentos de la bahía de Mejillones del Sur. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue describir cambios en la estructura genética de comunidades bacterianas asociadas a sedimentos marinos de la bahía de Mejillones del Sur. Para esto, se seleccionaron a lo largo de la costa, cuatro transectas de muestreo, las cuales fueron analizadas a partir de sedimentos obtenidos desde distintas profundidades mediante la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE). Este es el primer reporte en la literatura nacional acerca de la utilización de esta técnica de caracterización molecular, en especial, para una zona en la cual coexisten diversas actividades humanas como acuicultura, pesquería, generación de energía y servicios asociados a la minería.

Material y métodos

Obtención de muestras de sedimentos y determinación de parámetros físico-químicos en la columna de agua

Los sedimentos fueron recolectados con un box-core de 225 cm^2 de superficie, a partir de cuatro transectas perpendiculares a la línea de costa, localizadas en distintos puntos de la bahía de Mejillones, ($23,5^{\circ}\text{S}$), e individualizadas como T1: Punta Chacaya, T2: Industrial, T3: Capitanía y T4: Punta Rieles (Fig. 1). Desde cada transecta se recolectaron muestras de sedimentos en triplicado a partir de sucesivos dragados a 10 m, 25 m, 50 m y 75 m de profundidad. Cada muestra fue almacenada en frascos plásticos estériles de 50 mL de capacidad (Corning) y mantenidas a 4°C para su transporte al laboratorio de Microbiología de Sedimentos de la Universidad de Antofagasta. Este procedimiento se repitió tres veces; en septiembre 2005, diciembre 2005 y mayo 2006. Adicionalmente, al momento del muestreo, se registraron las variables físico-químicas de la columna de agua como temperatura, oxígeno disuelto y clorofila, por medio de una sonda multiparámetro YSY modelo 6600 y un CTD SeaBird 19 Plus. El análisis de materia orgánica se realizó mediante la metodología descrita por Nelson & Sommers (1982).

Extracción de ADN y purificación

Las muestras de sedimentos obtenidas por dragado, en triplicado, fueron mezcladas en partes iguales para posteriormente extraer el ADN genómico de las bacterias siguiendo la metodología descrita por Tsai & Olson (1991).

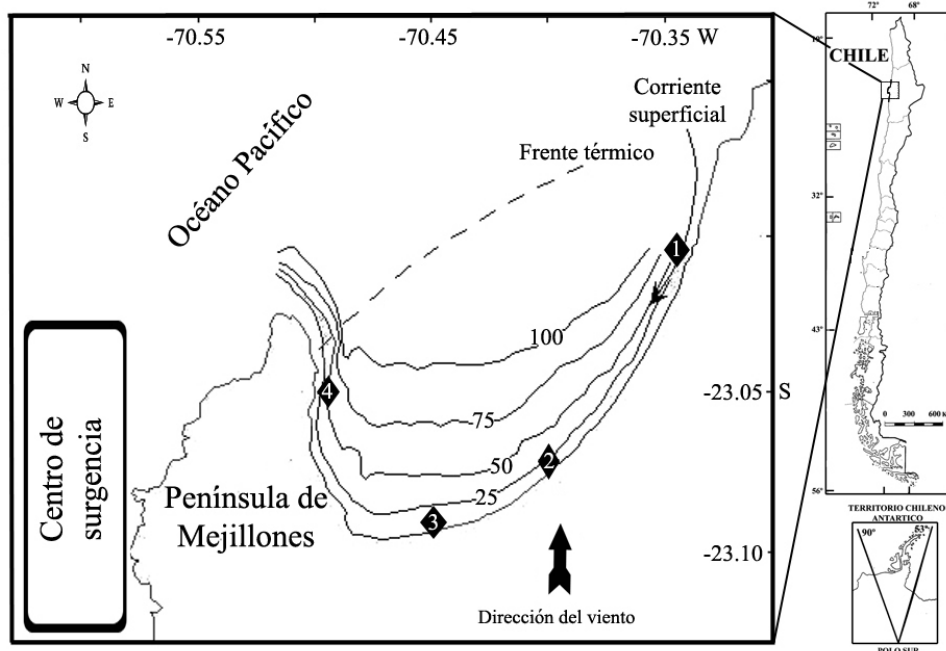


Figura 1

Mapa de las transectas de muestreo localizadas en la bahía de Mejillones del Sur, Chile

Map of the sampling stations in Mejillones del Sur bay, Chile

Tabla 1

Partidores utilizados para la amplificación de fragmentos de 16S rADN

Primers used for the amplification of 16S rDNA fragments

Oligonucleótido	Posición	Target	Secuencia
EUB f933	933-954	Bacteria regions V6-V8	5"-GC-clamp-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3"
EUB r1387	1387-1368	Bacteria regions V6-V8	5"-GCCCGGGAACGTATTCACCG-3"
GC-clamp*			5"-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGACACGGGGG

* Para análisis de DGGE se sintetizó en la posición 5'-end una abrazadera rica en GC.

Para esto, las bacterias asociadas a 1 g de muestra de sedimento fueron lisadas por medio de lisozima (Lysozyme, Sigma Chemical Co.) y fraccionamiento físico, por medio del congelamiento y calentamiento ('freeze-thaw'). Posteriormente, el ADN fue extraído con dodecyl sulfato sódico (SDS) y fenol-cloroformo, para posteriormente ser precipitado con etanol al 100% a -20°C durante 12 h. Las moléculas de ARN fueron removidas por medio de la incubación con ARNasa A (0,2 µg µL⁻¹) desde los extractos crudos. Posteriormente, el ADN libre de ARN fue purificado con una columna Elutip-d (Scheicher & Schuell, Keene, N.H., U.S.A.), con un prefiltro Scheicher & Schuell NA010/27 (0,45 µm, acetato de celulosa). Por último el ADN fue

recuperado desde la columna siguiendo las instrucciones del fabricante.

Partidores y amplificación por PCR

Fragmentos de 16S rADN fueron amplificados utilizando los partidores EUBf933-GC-clamp y EUBr1387 (Tabla 1), los cuales son específicos para la secuencia conservada del 16S rADN del dominio Bacteria (Iwamoto *et al.* 2000). Para prevenir la disociación completa de los fragmentos de ADN durante el análisis por DGGE, una abrazadera ('clamp') de 40-bp rica en GC fue incorporada en la posición 5' final del partidor EUBf933 (Myers *et al.* 1985). Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando ADN polimerasa

(AmpliTaQ Gold; Applied Biosystem), en un volumen total de 50 μL de la mezcla para PCR. Las concentraciones de los distintos componentes fueron 3 mM de cloruro de magnesio y 20 pmol de cada partidor. El protocolo de PCR utilizado fue con 'hot start' a 95°C por 9 min, seguido de un 'touchdown': la temperatura de alineamiento se calibró inicialmente a 65°C y luego se redujo en 0,5°C por cada ciclo hasta llegar a 55°C, seguida de una extensión de los partidores a 72°C por 3 min. Posteriormente, se realizaron 15 ciclos adicionales a 55°C por 1 min (alineamiento de los partidores), con una desnaturación a 94°C, por 1 min y extensión de los partidores a 72°C, por 3 min. Finalmente, se realizó un paso de extensión a 72°C por 7 min.

Análisis por electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Aproximadamente 300 ng de los productos obtenidos por PCR fueron cargados sobre un gel de poliacrilamida (6,5% p/v), conteniendo un gradiente de desnaturación del 45% al 65% (urea-formamida). La electroforesis fue llevada a cabo a 55°C por 12 h a 100V en una solución buffer de 1x TAE. Luego, los geles se tiñeron por 20 min con SYBR Gold (nucleic acid, Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles de DGGE fueron digitalizados por medio de un transiluminador (Vilber Lourmat, modelo TFX20M) con cámara digital (Q-Imaging modelo micropublisher 3.3). Las imágenes de los geles se analizaron para generar un perfil densitométrico de las bandas mediante el programa GelPro Analyzer para Windows (v.4.0.00.00.001, Media Cybernetic), el cual fue exportado a una planilla de datos Microsoft Excel v.2003 para Windows. La detección de las bandas fue registrada cuando la cumbre de éstas excedió el 1% del total de los picos de la gráfica. Para evitar el efecto de bandas no reproducibles o desviaciones de PCR (sesgo de PCR), se compararon ampliaciones paralelas de PCR de la misma muestra, obteniéndose perfiles de DGGE similares. Para el análisis de la comunidad bacteriana, los datos desde la planilla Excel fueron utilizados con el programa Primer 6 para Windows (v 6.1.6, Primer-E Ltda), para construir diagramas de agregación mediante media de grupos y escalamiento métrico multidimensional (MDS); para ello se utilizó la matriz de similitud de Bray & Curtis (1975).

Resultados

Análisis de bandas obtenidas por DGGE a través de MDS y análisis de agrupamiento

El análisis genético por medio de DGGE para las distintas transectas analizadas se muestra en la Fig. 2, a partir de cuatro geles que cubren un total de 43 muestras de sedimentos obtenidos en distintas profundidades y

períodos de muestreo. El análisis de estos geles, a partir de la generación de perfiles densitométricos de bandas, resultó en la detección total de 840 bandas, las cuales fueron registradas cuando la cumbre de éstas excedió el 1% del total de los picos de la gráfica (Tabla 2). El promedio de bandas para todos los sectores analizados fue de $19,5 \pm 6,1$, las que variaron entre 7 bandas para el sector Industrial (T2) a una profundidad de 10 m, en septiembre de 2005, hasta 32 bandas para el sector Punta Chacaya (T1), a una profundidad de 50 m, en diciembre de 2005. Los cambios espaciales y temporales en la estructura de las comunidades revelaron que los patrones de bandas de los sedimentos obtenidos desde los 10 m de profundidad en septiembre de 2005, en Punta Chacaya (T1) e Industrial (T2), presentaron una estructura de comunidad diferente a los perfiles obtenidos para sedimentos recolectados a los 25, 50 y 75 m de profundidad (Fig. 3a y b). Coincidentemente, la construcción de clústeres para estos patrones de bandas, mostró valores de homogeneidad del 60 y 50% para las transectas T1 y T2, respectivamente (Fig. 3a y b). Por el contrario, el análisis de las transectas Capitanía (T3) y Punta Rieles (T4) mostró, tanto por MDS como por el análisis de agrupamiento, la presencia de 3 y 2 clústeres, respectivamente.

Análisis de variables físico-químicas

El análisis de variables físico-químicas se observa en la Fig. 4. Los perfiles de temperatura para las distintas transectas al momento de los muestreos de sedimentos evidenciaron, en general, patrones homogéneos sin la presencia de una clara termoclina superficial en especial para el período de septiembre 2005 y mayo 2006. Sin embargo, para el período de diciembre 2005 la distribución de la temperatura en las distintas transectas fue homogénea, a excepción de la transecta 1 (Fig. 4a). Esta última evidenció una pequeña termoclina superficial a los 6 m, para, a partir de esta profundidad, mantenerse homogénea en comparación de los perfiles registrados para las otras transectas (Fig. 4a).

Los perfiles de oxígeno disuelto en la columna de agua mostraron variaciones estacionales de este parámetro, en especial para septiembre 2005 y mayo 2006, con niveles de oxígeno por sobre los 5 mg L⁻¹ para cada una de las transectas hasta los 21 m, a excepción de la transecta 1, la cual bajo los 13 m cayó con niveles inferiores a 2 mg L⁻¹. En diciembre 2005 se registró una disminución de este gas bajo los 6 mg L⁻¹ a partir de los 10 m de profundidad, para las transectas 1, 3 y 4, a diferencia de la transecta 2 con niveles inferiores a los 2 mg L⁻¹ a partir de los 6 m de profundidad (Fig. 4b).

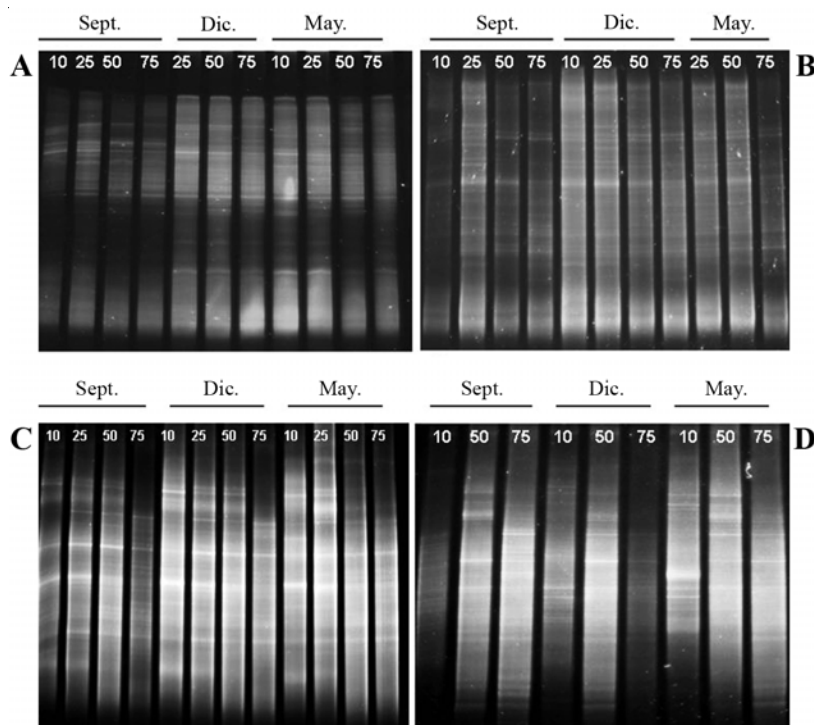


Figura 2

Visualización de gels de DGGE a partir de fragmentos del 16S rADN obtenidos por PCR para muestras recolectadas desde las transectas 1(A), 2(B), 3(C) y 4(D). El orden cronológico del análisis se expresa para septiembre 2005, diciembre 2005 y mayo 2006 para sedimentos obtenidos desde 10, 25, 50 y 75 m de profundidad

DGGE of PCR-amplified 16S rDNA fragments of sediments associated bacteria from different sample stations 1(A), 2(B), 3(C) and 4(D). The time course of the sediment samples analysis is indicated for September 2005, December 2005 and May 2006 for sediments sampled at 10, 25, 50 and 75 m deep

Tabla 2

Número de bandas detectadas por medio de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) desde las distintas transectas analizadas en tres períodos estacionales

Number of detected bands by the use of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) from the different sampling stations along different seasonal periods

Profundidad (m)	Fecha	Número de bandas				Promedio bandas
		T1	T2	T3	T4	
10	Sep-05	18	7	9	13	11,8
25	Sep-05	26	22	13	NA	20,3
50	Sep-05	24	15	13	25	19,3
75	Sep-05	24	17	15	25	20,3
Promedio bandas		23	15,3	12,5	21	
10	Dic-05	NA	18	10	26	18
25	Dic-05	24	19	16	NA	19,7
50	Dic-05	32	20	16	23	22,8
75	Dic-05	30	20	13	16	19,8
Promedio bandas		28,7	19,3	13,8	21,7	
10	May-06	27	NA	12	26	21,7
25	May-06	28	20	15	NA	21
50	May-06	29	19	13	22	20,8
75	May-06	26	20	14	20	20
Promedio bandas		27,5	19,7	13,5	22,7	

NA : No Analizada

La clorofila total para cada una de las transectas analizadas para los distintos períodos del estudio, mostró grandes variaciones entre septiembre y diciembre 2005 (Fig. 4c). Se observaron claramente los bajos niveles de este pigmento durante el período de muestreo de septiembre 2005, cuando los niveles registrados fueron inferiores a 4 mg L^{-1} a partir de los 2 m de profundidad. Inversamente, durante diciembre 2005, los niveles de clorofila detectados para las transectas 3 y 4 incrementaron su concentración por sobre 6 mg L^{-1} , a partir del nivel superficial hasta los 10 m de profundidad. Sin embargo, los perfiles obtenidos para las transectas 1 y 2 se mostraron homogéneos desde la superficie hasta los 16 m de profundidad (Fig. 4c).

Análisis de materia orgánica

La determinación de materia orgánica para los sedimentos recolectados desde cada una de las transectas durante los distintos períodos de muestreo se observan en la Fig. 5.

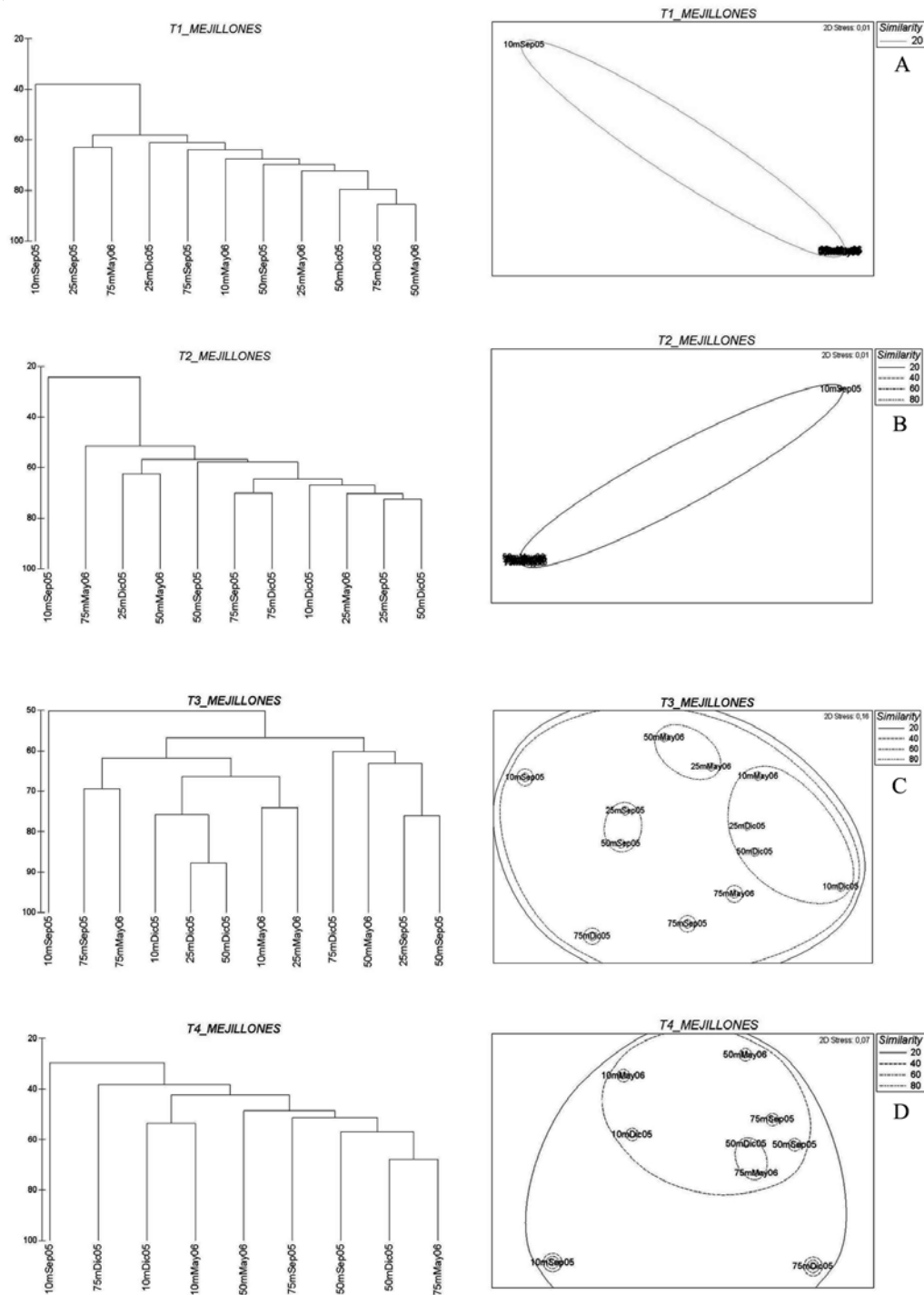


Figura 3

Análisis bidimensional por medio de MDS (columna derecha) y agrupamiento (columna izquierda) a partir de geles de DGGE para fragmentos del 16S rADN obtenidos por PCR para muestras recolectadas desde las transectas 1(A), 2(B), 3(C) y 4(D) durante septiembre 2005, diciembre 2005 y mayo 2006 para sedimentos obtenidos desde 10, 25, 50 y 75 m de profundidad

Two-dimensional plots of MDS (right column) and cluster (left column) analysis from DGGE patterns of sediment associated bacteria for sampling stations 1(A), 2(B), 3(C) and 4(D) along September 2005, December 2005 and May 2006 for sediments sampled at 10, 25, 50 and 75 m deep

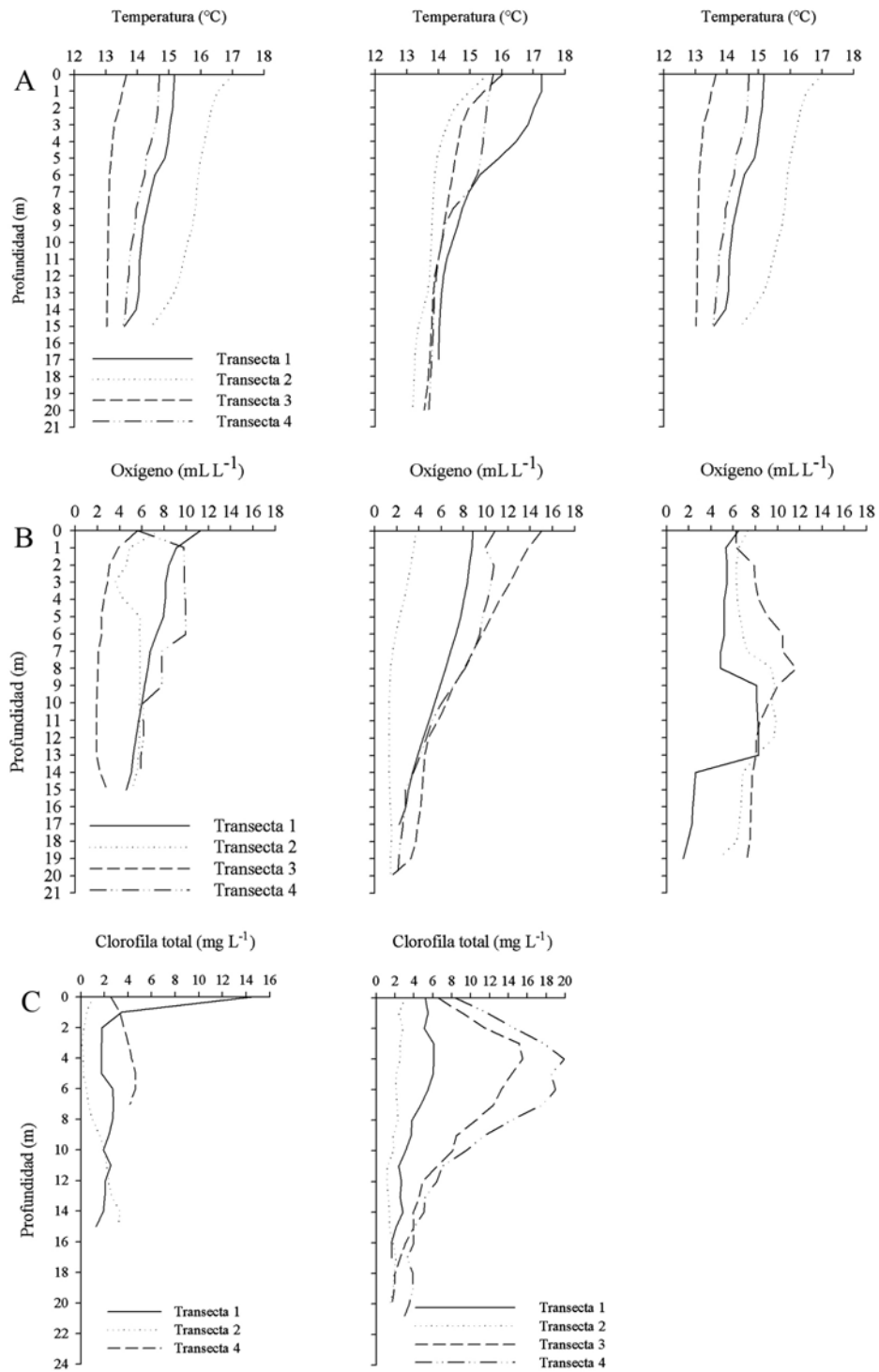


Figura 4

Perfiles de temperatura (A), oxígeno disuelto (B) y clorofila (C), registrados en la columna de agua para las distintas transectas, durante septiembre 2005 (columna izquierda), diciembre 2005 (columna central) y mayo 2006 (columna derecha)

Temperature (A), dissolved oxygen (B) and chlorophyll (C) patterns registered on seawater column for the different sampling stations during September 2005 (left column), December 2005 (central column) and May 2006 (right column)

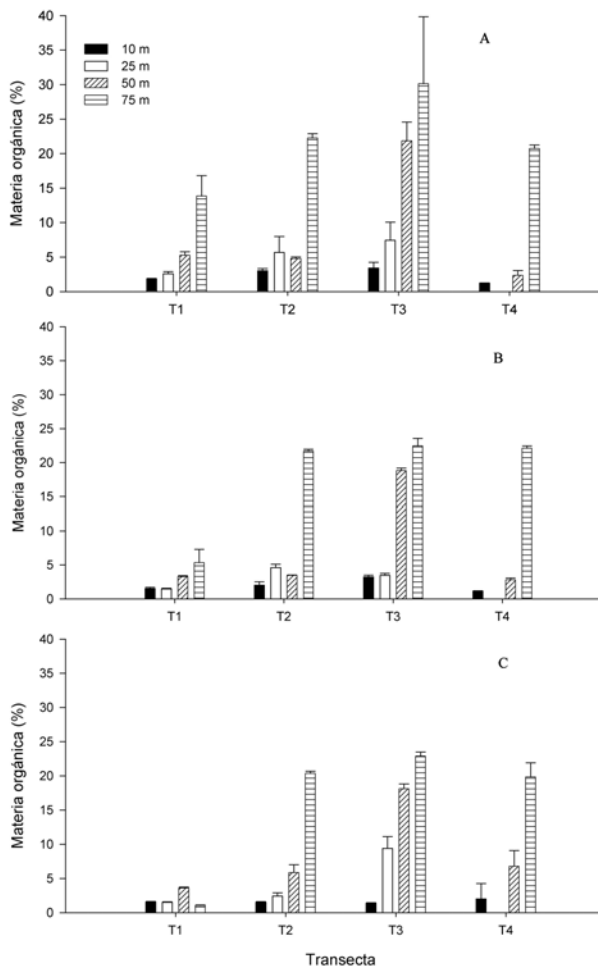


Figura 5

Porcentaje de materia orgánica de sedimentos marinos recolectados desde las transectas T1, T2, T3 y T4 durante septiembre 2005 (A), diciembre 2005 (B) y mayo 2006 (C). Los valores representan el promedio del análisis de muestras en triplicado \pm desviación estándar

Percentage of organic matter in marine sediments obtained from the sampling stations T1, T2, T3 and T4 during September 2005 (A), December 2005 (B) and May 2006 (C). Results represent the average of triplicate analyzed samples \pm standard deviation

Estos resultados muestran, en general, que sedimentos recolectados a profundidades inferiores a 25 m registraron niveles inferiores al 5% de materia orgánica. A diferencia de esto, sedimentos más profundos (75 m) mostraron valores de materia orgánica por sobre el 20%, sin grandes variaciones a nivel estacional.

Discusión

El análisis genético espacial y temporal a partir de la utilización de DGGE, mostró en general un alto número de bandas para los distintos geles analizados. Si bien cada una de las bandas totales detectadas representaría una especie bacteriana (Muyzer *et al.* 1993), la diversidad ecológica así como la estructura de la comunidad de los sedimentos marinos de la bahía de Mejillones del Sur evidenciaron una alta y compleja diversidad procariótica. La variación en la estructura genética de las comunidades bacterianas observadas para los sedimentos recolectados a 10 m de profundidad en septiembre 2005, desde las transectas T1 y T2, respecto de las transectas T3 y T4, reflejaría las diferentes condiciones que afectan a las comunidades microbianas. Como se ha señalado por Nelson *et al.* (2008) al estudiar comunidades bacterianas planctónicas marinas, cambios en la circulación de las aguas y de factores no tradicionalmente medidos por estudios oceanográficos, provocarían cambios estructurales en las comunidades procarióticas, como los observados en el presente estudio para las distintas transectas. Esto último se atribuye a que el movimiento de las aguas genera condiciones diferentes entre cada una de las transectas analizadas. De esta manera, el análisis de parámetros físico-químicos de la columna de agua reveló que en el caso de la temperatura, las diferencias son más evidentes al comparar las transectas entre sí, que al comparar los distintos tiempos de muestreo. Esto evidenciaría una mayor mezcla de la columna de agua para este período, debido a la entrada de masas de aguas provenientes del foco de surgencia que ingresarían por el margen noreste de la bahía, particularmente por el sector de la transecta 1 (Punta Chacaya). Este fenómeno puntualmente el margen costero de los 10 m de profundidad, hasta el sector de Capitanía de Puerto (T3) frente a la ciudad de Mejillones. A diferencia de la entrada de masas de aguas con la trayectoria de un giro ciclónico por el sector de Punta Chacaya, el sector de Punta Rieles (T4) se caracteriza por presentar pulsos de surgencia que entran desde afloramientos en el sector de Punta Angamos. Esto último marcaría diferencias en los patrones de circulación y en la estructura de comunidades bacterianas asociada a los 10 m de profundidad en el período de septiembre 2005. Se ha descrito que los mayores pulsos de surgencia en el sistema de Punta Angamos y que influirían en la dinámica interna de la bahía de Mejillones, ocurriría principalmente cuando comienza el período de primavera (Marín & Olivares 1999). En este período, el ingreso de aguas de surgencia de menor contenido de oxígeno disuelto, menor temperatura y mayor contenido de nutrientes, modifica la estructura de la columna de agua, provocando un ascenso de la zona mínima de oxígeno lo que hace que una mayor extensión del piso marino de la bahía presente

ambientes de deposición pobres en oxígeno (Valdés *et al.* 2008). Como consecuencia de esto, se genera en la superficie un frente térmico que transforma la bahía en una sombra de surgencia con la consecuente retención de los nutrientes en superficie y una alta productividad primaria (Marín *et al.* 2003). Esto último se observa en los perfiles de clorofila, cuyas concentraciones son evidentemente mayores durante diciembre, correspondiendo a un período de alta productividad. La entrada de nutrientes a la bahía puede ser a través de los sectores T1 y T4 lo que produciría afloramientos durante septiembre, lo que consecuentemente incrementaría la diversidad genética de comunidades bacterianas. Por ejemplo, mediante la utilización de DGGE se ha observado que el ingreso de nutrientes al mar Mediterráneo produciría diferencias en el desarrollo y la estructura de las comunidades bacterianas (Schäfer *et al.* 2001, Lebaron *et al.* 2001). Esto podría incrementar la proliferación de poblaciones bacterianas fisiológicamente activas, generándose así diferencias en la estructura de las comunidades, lo cual ha sido reportado por Araya *et al.* (2003). Si bien el número de bandas detectadas en las estaciones T1 y T2 fue superior con 18 y 13 especies, respectivamente, en comparación con las 7 y 9 bandas observadas en el análisis de geles obtenidos desde las estaciones de muestreo T3 y T4 para el mismo período. Las diferencias entre la estructura de la comunidad de los sedimentos analizados a los 10 m respecto de los sedimentos recolectados a otras profundidades, podrían atribuirse a la aparición de nuevas bandas que no fueron detectadas en las otras muestras analizadas o también por efecto de sesgo asociado a la técnica del PCR. Esto es, diferencias en el número de copias de los genes o heterogeneidad del 16S rADN dentro de las especies. Si bien es cierto que la técnica de PCR presenta algunas desventajas, las técnicas genéticas de huella dactilar como PCR-DGGE y PCR-temperatura (T)GGE pueden clarificar los cambios en las comunidades microbianas evitando así la utilización de métodos que incluyan el cultivo bacteriano por medio de técnicas tradicionales (Santegoeds *et al.* 1998, Van Hannen *et al.* 1999, Schäfer *et al.* 2001, Traian *et al.* 2008).

La estabilidad relativa observada para las comunidades bacterianas obtenidas desde las transectas T1 y T4 a partir de bacterias asociadas a sedimentos por debajo de los 10 m de profundidad, podría ser una respuesta a una estabilidad mecánica de los sedimentos, los cuales no experimentarían bioturbación (Ortlieb *et al.* 2000) como en el área costera de los 10 m de profundidad. Estos sedimentos se caracterizan por poseer restos orgánicos depositados en la zona más somera de la bahía, los cuales corresponden a una mezcla de materia orgánica metabolizable y no metabolizable, de manera que se espera que ocurra una alta degradación de este último material debido a que son depositados en un ambiente

con altos niveles de oxígeno (Valdés *et al.* 2005). Esto permite suponer que en el área costera de los 10 m existió una alta actividad bacteriana asociada a la transformación de la materia orgánica, lo que explicaría la diferencia en la estructura de las comunidades de estas muestras, respecto de la diversidad genética observada para los sedimentos de las otras muestras analizadas. En conclusión, los resultados observados en el presente estudio mostraron que los patrones de bandas obtenidos por DGGE y su análisis por medio de MDS o la construcción de árboles de agrupamiento ('clusters') fue discriminatorio de acuerdo a las interrogantes planteadas. Sin embargo, para entender los mecanismos que controlan la estructura y función de las comunidades bacterianas asociadas a sedimentos, se requiere de un análisis seriado en el tiempo que incluya el registro de un amplio número de parámetros físico-químicos y oceanográficos en el área de estudio.

Agradecimientos

Agradecemos el financiamiento del proyecto Innova Chile en su línea de financiamiento de Interés Público N° 04CR7IXM-04. Los autores también agradecen a los evaluadores anónimos por los comentarios que contribuyeron a mejorar el presente manuscrito.

Literatura citada

- Amann RI, W Ludwig & K-H Schleifer. 1995.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
- Araya R, K Tani, T Takagi, N Yamaguchi & M Nasu. 2003.** Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 43(1): 111-119.
- Barber R & R Smith. 1981.** Coastal upwelling ecosystems. En: Longhurst AR (ed). *Analysis of marine ecosystems*, pp. 31-68. Academic Press, Londres.
- Blanco JL, AC Thomas, ME Carr & PT Strub. 2001.** Seasonal climatology of hydrographic conditions in the upwelling region off Northern Chile. *Journal of Geophysical Research Oceans* 106: 11451-11467.
- Bleck J. 1998.** Estructura comunitaria de los ensambles zooplanctónicos epipelágicos del norte de Chile durante el desarrollo del evento "El Niño" 1991-1992. Tesis de Biología Marina, Universidad Arturo Prat, Iquique, 39 pp.
- Bray JR & JT Curtis. 1975.** An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27: 325-349.
- Brinkhoff T, CM Santegoeds, K Sahm, J Kuever & G Muyzer. 1998.** A polyphasic approach to study the diversity and vertical distribution of sulfur-oxidizing thiomicrospira species in

- coastal sediments of the German Wadden Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4650-4657.
- Bruns MA, JR Stephen, GA Kowalchuk, JI Prosser & EA Paul. 1999.** Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2994-3000.
- Casamayor RO, C Pedrós-Alió, G Muyzer & R Amann. 2002.** Microheterogeneity in 16S rDNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1706-1714.
- Dumestre JF, EO Casamayor, R Massana & C Pedrós-Alió. 2001.** Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquatic Microbial Ecology* 26: 209-221.
- Ellis RJ, P Morgan, AJ Weightmann & AJ Fry. 2003.** Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3223-3230.
- Escribano R. 1998.** Population dynamics of *Calanus chilensis* in the Chilean Eastern Boundary Humboldt Current. *Fisheries Oceanography* 7(3/4): 245-251.
- Escribano R & P Hidalgo. 2000.** Spatial distribution of copepods in the north of the Humboldt Current region off Chile during coastal upwelling. *Journal of Marine Biology* 80: 1-8.
- Escribano R, V Marín, P Hidalgo & G Olivares. 2002.** Interacciones físico-biológicas en el ecosistema pelágico en la zona costera del área norte del sistema de la corriente de Humboldt. En: Castilla JC & JL Largier (eds). *The Oceanography and Ecology of the Nearshore and Bays in Chile*, pp. 145-175. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago.
- González HE, G Daneri, D Figueroa, JL Iriarte, N Lefevre, G Pizarro, R Quiñónez, M Sobarzo & A Troncoso. 1998.** Producción primaria y su destino en la trama trófica pelágica y océano profundo e intercambio océano-atmósfera de CO₂ en la zona norte de la corriente de Humboldt (23°S): posibles efectos del evento El Niño, 1997-98 en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 71: 429-458.
- Iriarte J, G Pizarro, V Troncoso & M Sobarzo. 2000.** Primary production and biomass of size-fractionated phytoplankton of Antofagasta, Chile (23-24°S) during pre-El Niño and El Niño 1997. *Journal of Marine Systems* 26: 37-51.
- Iwamoto T, K Tani, K Nakamura, Y Suzuki, M Kitagawa, M Eguchi & M Nasu. 2000.** Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 129-141.
- Kenzaka T, N Yamaguchi, K Tani & M Nasu. 1998.** RNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiology* 144: 2085-2093.
- Lange C & W Berger. 1993.** Paleoclimatic significance of Santa Barbara laminated sediments: A history of upwelling and El Niño Events. *EOS Transactions, American Geophysical Union* 74(3): 372-375.
- Lebaron P, P Servais, M Troussellier, C Courties, G Muyzer, L Bernard, H Schäfer, R Pukall, E Stackebrandt, T Guindulain & J Vives-Rego. 2001.** Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in abundances, activity and composition. *FEMS Microbiology Ecology* 34: 255-266.
- Marín V & G Olivares. 1999.** Estacionalidad de la productividad primaria en bahía Mejillones del Sur (Chile): una aproximación proceso-funcional. *Revista Chilena de Historia Natural* 72: 629-641.
- Marín V, L Delgado & R Escribano. 2003.** Upwelling shadows at Mejillones bay (northern Chilean coast): a remote sensing in situ analysis. *Investigaciones Marinas* 31(2): 47-55.
- Marín V, L Rodríguez, L Vallejo, J Fuenteseca & E Oyarce. 1993.** Efectos de la surgencia costera sobre la productividad primaria primaveral de la Bahía Mejillones del Sur (Antofagasta, Chile). *Revista Chilena de Historia Natural* 66: 47-491.
- Mullis KB & F A Faloon. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Murray AE, CM Preston, R Massana, LT Taylor, A Blakis, K Wu & EF DeLong. 1998.** Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2585-2595.
- Myers RM, SG Fischer, LS Leman & T Maniatis. 1985.** Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 13: 3131-3145.
- Muyzer G, EC de Waal & AG Uitterlinden. 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer G, T Brinkhoff, U Nübel, C Santegoeds, H Schäfer & C Wawer. 1998.** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En: Akkermans ADL, JD van Elsas & FJ de Brijn (eds) *Molecular microbial ecology manual* 3.4.4: 1-27. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Nelson DW & LE Sommers. 1982.** Total organic carbon and organic matter. En: Page AL, RH Miller & DR Keeney (eds), *Method of soil analysis. Part. 2*: 539-579. American Society of Agronomy, Madison.
- Nelson JD, S Boehme, C Reimers, R Sherrell & L Kerkhof. 2008.** Temporal patterns of microbial community structure in the Mid-Atlantic Bight. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 484-493.
- Ortlieb L, R Escribano, R Follegati, O Zúñiga, I Kong, L Rodríguez, J Valdés, N Guzmán & P Iratchet. 2000.** Ocean-climatic changes during the last 2000 years in a hypoxic marine environment of Northern Chile (23°S). *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 221-242.
- Rosado AS, GF Duarte, L Seldin & JD van Elsas. 1998.** Genetic diversity of nifH gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel

- electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4650-4657.
- Sahm K & UR Berninger. 1998.** Abundance, vertical distribution, and community structure of benthic prokaryotes from permanently cold marine sediments (Svalbard, Arctic Ocean). *Marine Ecology Progress Series* 165: 71-80.
- Santegoeds CM, TG Ferdelman, G Muyzer & D Beer. 1998.** Structural and functional dynamic of sulfate reducing populations in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3731-3739.
- Schäfer H, L Bernard, CC Courties, P Lebaron, P Servais, R Pukall, E Stackebrandt, M Trousselier, T Guindulain, J Vives-Rego & G Muyzer. 2001.** Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology* 34: 243-253.
- Sobarzo M & D Figueroa. 2001.** The physical structure of a cold filament in a Chilean upwelling zone (Peninsula de Mejillones, Chile, 23°S). *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 48: 2699-2726.
- Strub P, J Mesias, V Montecinos, J Rutllant & S Marchant. 1998.** Coastal oceanic circulation off western South America. En: Robinson A & K Birnk (eds) *The Sea*, pp. 273-314. John Wiley, Nueva York.
- Summerhayes C, K Emeis, M Angel, R Smith & B Zeitzschel. 1995.** Upwelling in the ocean: modern processes and ancient records. *Environmental Sciences Research Report* 18: 1-37.
- Thomas A, J Blanco, M Carr, P Strub & J Osses. 2001.** Satellite-measured chlorophyll and temperature variability off northern Chile during the 1996–1998 La Nina and El Nino. *Journal of Geophysical Research* 106(C1): 899-915.
- Traian B, B van Breukelen, M Braster, N van Straalen & W Röling. 2008.** Spatial heterogeneity in sediment-associated bacterial and eukaryotic communities in a landfill leachate-contaminated aquifer. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 534-543.
- Tsai YL & BH Olson. 1991.** Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1070-1074.
- Valdes J, D Roman, G Alvarez, L Ortlieb & M Guinez. 2008.** Metals content in surface waters of an upwelling system of the northern Humboldt Current (Mejillones Bay, Chile). *Journal of Marine Systems* 71: 18-30.
- Valdes J, G Vargas, A Sifeddine, L Ortlieb & M Guinez. 2005.** Distribution and enrichment evaluation of heavy metals in Mejillones Bay (23°S), Northern Chile: Geochemical and statistical approach. *Marine Pollution Bulletin* 50(12): 1558-1568.
- Van Hanne E, J, M Veninga, J Bloem, HJ Gons & HJ Laanbroek. 1999.** Genetic changes in the bacterial community structure associated protistan grazers. *Archaeal Hydrobiology* 145: 25-38.
- Vargas G. 2002.** Interactions ocean-atmosphère au cours des derniers siècles sur la côte du Désert d'Atacama, analyse multiproxies des sédiments laminés de la Baie de Mejillones (23°S). PhD Thesis, Université Bordeaux I, France, 290 pp.
- Wagner M, R Amann, H Lemmer & KL Schleifer. 1993.** Probing activate sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied Environmental Microbiology* 59: 1520-1525.
- Ward N, FA Rainey, B Goebel & E Stackebrandt. 1995.** Identifying and culturing the unculturable: a challenge for microbiologist. En: Alsopp D, RR Colwell & DL Hawksworth (eds). *Microbial Diversity and Ecosystem Function*, pp. 89-110. CAB International, Wallingford.

Recibido el 8 de enero de 2008 y aceptado el 29 de septiembre de 2008