



***ESTUDIO METAGENÓMICO DE LA DIVERSIDAD PROCARIOTA Y
EUCARIOTA DE AGUA Y SEDIMENTO MARINO DE LA ISLA LIVINGSTON,
ANTÁRTIDA***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C.
2019**



***ESTUDIO METAGENÓMICO DE LA DIVERSIDAD PROCARIOTA Y
EUCARIOTA DE AGUA Y SEDIMENTO MARINO DE LA ISLA LIVINGSTON,
ANTÁRTIDA***

Natalia Alejandra Macana Díaz

Xilena Yulieth Muñoz Paladinez

Martha Lucía Posada Buitrago, Ph.D.

ASESORA

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C.
2019**

DEDICATORIA

A las personas que se cruzaron en nuestro camino para cosechar un granito de virtud y esperanza de que sí se puedan alcanzar los sueños. Solo basta creer en la fuerza de ellos.

Especialmente a mi familia, a mis papás, Leo y Astrid, a mis hermanos, Oscar y Lina, gracias por todo; por escuchar, por estar, por la vida, por la comprensión y fundamentalmente gracias por el amor.

A mis amigas de la vida, Daniela y Nathalie, por aventurarse conmigo siempre, por seguir mis locuras, por reír conmigo, por comprenderme. A mis futuras colegas y amigas, Laura y Lina, por acompañarme en este macroscópico camino de la bacteriología, por motivarme a seguir en los momentos más difíciles y por permitirme reír y ser quien soy junto a ustedes

Natalia

Especialmente a mis papás “Joselom” y “Yeye”, los seres que más amo en la vida, gracias por ser ese polo a tierra que a pesar de la distancia y de la situación, hacen que los momentos sean mejores, gracias por el amor incondicional, por enseñarme a valorar las pequeñas cosas de la vida.

A mi hermana Karen “Comino” y a mi hermano Mao, gracias por estar ahí, por ser mis mejores amigos y compañeros, gracias por reír conmigo y comprenderme aún en los peores momentos. A mis pequeñitos Simba y Mateo, por mostrarme el amor más puro y desinteresado.

Xilena

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por habernos prestado sus instalaciones y ser ese escenario de tantas experiencias que nunca olvidaremos.

A nuestras familias y amigos por el apoyo en todos los momentos de alegría y desesperación.

A la profesora Martha Lucía Posada, por introducirnos en el proyecto y depositar su confianza en nosotras, por estar siempre presente a pesar de las circunstancias, y ser quien nos impulsa a luchar por nuestros sueños.

A la profesora Ligia Consuelo Sánchez y el profesor Edison Tello, por hacernos partícipes de este increíble proyecto.

“Todo lo que hemos descubierto hasta ahora es algo insignificante en comparación con lo que se esconde en el gran tesoro de la naturaleza”.

Antonie van Leewenhoek (1680)

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras	
Lista de tablas	
Resumen	
Introducción	
Objetivos	
1. ANTECEDENTES	1
2.MARCO REFERENCIAL	4
2.1 LA ANTÁRTIDA	4
2.1.1 Historia.....	5
2.2 Isla Livingston	6
2.3 Tratado Antártico	7
2.3.1 Tratado Antártico Colombia	8
2.4 III Expedición Científica de Colombia a la Antártica “Almirante Padilla” Verano Austral 2016 – 2017.....	10
2.5 Microorganismos de la Antártida	11
2.6 Metagenómica	15
2.6.1 Historia de la metagenómica	16
2.7 Herramientas Bioinformáticas	17
2.7.1 Secuenciación de Próxima Generación (NGS)	17
2.8 Región ARNr 16S	17
2.9 Región ARNr 18S	18
2.10 Unidades taxonómicas operacionales (OTU)	18
2.11 Software Para Análisis Bioinformático	18
2.11.1 QIIME	18
2.11.2 BLASTN	19
2.12 Herramientas Biotecnológicas.....	19
2.12.1 Bioprospección.....	19
2.12.2 Biorremediación.	20

3. DISEÑO METODOLÓGICO	20
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	20
3.2 Universo, Población y Muestra.....	20
3.2.1 Universo	20
3.2.2 Población	20
3.2.3 Muestra	21
3.3 Hipótesis	21
3.4 Variables e indicadores	21
3.4.1 Variable independiente.....	21
3.4.2 Variable Dependiente	21
3.4.3 Indicadores.....	21
3.5 Técnicas y procedimientos	22
3.5.1 Fase 1. Muestreo de agua y sedimentos marinos tipo lodo	22
3.5.2 Fase 2. Filtración de la muestra de agua.....	24
3.5.3 Fase 3. Extracción de ADN	25
3.5.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa	25
3.5.3.2 Electroforesis en Gel de Agarosa	27
3.5.3.3 Cuantificación de ADN	28
3.5.4 Fase 4. Secuenciación	28
3.5.5 Fase 5. Análisis Bioinformático.....	30
4. Resultados	32
4.1 A ANÁLISIS METAGENÓMICO DEL GEN ARN RIBOSOMAL 16S	32
4.2 ANÁLISIS METAGENÓMICO DEL GEN ARN RIBOSOMAL 18S	49
5. Discusión	61
6. Conclusiones	69
7. Referencias Bibliográficas	70
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características geológicas y geográficas de la Antártida (Pág. 5)
- Figura 2.** Ubicación geográfica de las islas Shetland del sur (Pág. 6)
- Figura 3.** Mapa Político de las Islas Shetland del Sur (Pág. 7)
- Figura 4.** Buque ARC 20 de Julio (Pág. 10)
- Figura 5.** Vista satelital del muestreo realizado en la isla Livingston, Antártida (Pág. 22)
- Figura 6.** Toma de muestras (Pág. 23)
- Figura 7.** Almacenamiento de muestras (Pág. 24)
- Figura 8.** Equipo de filtración por membrana (Pág. 25)
- Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa (Pág. 27)
- Figura 10.** Resumen Procedimiento para metagenómica de muestra de agua marina (Pág. 31)
- Figura 11.** Resumen Procedimiento para metagenómica de muestra de sedimento marino tipo lodo (Pág. 31)
- Figura 12.** Mapa de calor de abundancia de secuencias encontradas en el análisis del gen ARNr 16S (Pág. 33)
- Figura 13.** Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel de filo del análisis del gen ARNr 16S (Pág. 34)
- Figura 14.** Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel de clase del análisis del gen ARNr 16S (Pág. 35)
- Figura 15.** Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel de orden del análisis del gen ARNr 16S (Pág. 37)
- Figura 16.** Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel de familia del análisis del gen ARNr 16S (Pág. 38)
- Figura 17.** Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel de genero del análisis del gen ARNr 16S (Pág. 40)
- Figura 18.** Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel de especie del análisis del gen ARNr 16S (Pág. 42)
- Figura 19.** Curva de rarefacción de la diversidad alfa de la región ARNr 16S (Pág. 48)

Figura 20. Mapa de calor de abundancia de secuencias encontradas en el análisis del gen ARNr 18S (Pág. 50)

Figura 21. Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel de supergrupos del análisis del gen ARNr 18S (Pág. 51)

Figura 22. Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel del segundo nivel taxonómico encontrado en el análisis del gen ARNr 18S (Pág. 52)

Figura 23. Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición del tercer nivel taxonómico encontrado en el análisis del gen ARNr 18S (Pág. 53)

Figura 24. Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel del siguiente taxón (Nivel 4,6,7,8,9) encontrado en el análisis del gen ARNr 18S (Pág. 54)

Figura 25. Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel del siguiente taxón (Nivel 10) encontrado en el análisis del gen ARNr 18S (Pág. 56)

Figura 26. Mapa de calor de abundancia y diagrama de composición a nivel del siguiente taxón (Nivel 12) encontrado en el análisis del gen ARNr 18S (Pág. 58)

Figura 27. Curva de rarefacción de la diversidad alfa de la región ARNr 18S (Pág. 60)

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Expediciones realizadas en marco del programa antártico de Colombia (Pág. 9)

Tabla 2. Indicadores (Pág. 21)

Tabla 3. Descripción del Muestreo (Pág. 23)

Tabla 4. Cálculos Master Mix (Pág. 26)

Tabla 5. Condiciones de PCR (Pág. 26)

Tabla 6. Primers PCR (Pág. 27)

Tabla 7. Concentración de ADN extraído de las muestras (Pág. 28).

Tabla 8. Primers utilizados para secuenciación ARNr16S (Pág. 29).

Tabla 9. Primers utilizados para secuenciación ARNr18S (Pág. 30)

Tabla 10. Secuencias obtenidas a través del procesamiento metagenómico del ARNr 16S (Pág. 32).

Tabla 11. OTU identificadas y No identificadas a través del procesamiento metagenómico del ARNr 16S (Pág. 32).

Tabla 12. Diversidad Taxonómica de la comunidad procariota encontrada en la muestra de agua marina y de sedimento marino tipo lodo a partir del análisis metagenómico del ARNr 16S (Pág. 45).

Tabla 13. Secuencias obtenidas a través del procesamiento metagenómico del ARNr 18S (Pág. 49).

Tabla 14. OTU identificadas y No identificadas a través del procesamiento metagenómico del ARNr 18S (Pág. 49).



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO

***ESTUDIO METAGENÓMICO DE LA DIVERSIDAD PROCARIOTA Y
EUCARIOTA DE AGUA Y SEDIMENTO MARINO DE LA ISLA LIVINGSTON,
ANTÁRTIDA***

RESUMEN

La Antártida el lugar más frío del planeta, ha sido catalogada por mucho tiempo como poco portador de microorganismos. Por sus características geológicas y por disputas territoriales el lugar había sido poco estudiado. Con la firma del Tratado Antártico en el año 1959 la Antártida se ha visitado y aprovechado únicamente con fines científicos. La “Expedición Almirante Padilla”, es la tercera expedición organizada por Colombia desde que se unió al tratado Antártico. Durante esta expedición en la isla Livingston, se recogieron las muestras de agua y sedimento marino, que se estudiaron en este proyecto a través de técnicas de metagenómica.

Se realizó extracción de ADN a las dos muestras por el kit comercial de extracción ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep, el cual fue analizado por la plataforma de secuenciación de próxima generación Illumina Mi Seq, a partir de las regiones

16S y 18S del rRNA de procariotas y eucariotas, respectivamente. Los datos se analizaron por los programas bioinformáticos DADA2 y QIIME, las secuencias obtenidas se compararon en el genbank por el algoritmo BLASTN.

En análisis se obtuvieron 244390 secuencias crudas, de las cuales se clasificaron como OTU (Unidades Taxonómicas Operacionales) solo 405 secuencias. El 41% de estas se calificaron taxonómicamente desde phylum, clase, orden, familia, género y especie, tanto para procariotas como eucariotas, y el 59% restante correspondieron a secuencias no identificadas. Los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* fueron predominantes en procariotas y los filos SAR y *Opisthokonta* en el caso de los eucariotas.

Palabras claves:

Metagenómica, RNA ribosomal (rRNA), Secuenciación de próxima generación (SNG), Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), Biorremediación, Bioprospección.

INTRODUCCIÓN

La Antártida es el cuarto continente más grande del planeta, un espacio terrestre con un clima extremo, una altura promedio de 2.000 metros sobre el nivel del mar (msnm), sobre casi toda la superficie del suelo prevalece el clima polar donde la temperatura promedio del mes más cálido no supera los 0 °C. Es también la Antártida el continente con el promedio de humedad más bajo de la Tierra, y el de elevación sobre el nivel del mar promedio más alto². Esta serie de variables, hacen que la Antártida sea un continente climáticamente único, que lo convierte en un “laboratorio de campo para taxonomía, diversidad, ecología, evolución y hasta estudios biotecnológicos”¹.

Las comunidades microbianas que habitan allí, son importantes por las condiciones de temperatura en las que viven, por sus niveles de salinidad, por la biodisponibilidad limitada de nutrientes y las atmósferas que soportan, estas propiedades ambientales únicas del continente Antártico proveen a los microorganismos características singulares; el estudio de estas especies extremófilas, puede propiciar el desarrollo de aspectos como la biotecnología, la bioprospección y la biorremediación.

A través de los años las investigaciones de este tipo se han desarrollado en el Ártico², esta zona en relación a la Antártida ha sido de mucho más fácil acceso. El continente Antártico fue descubierto apenas en el siglo XIX³, esto y todas las características geográficas de la zona hicieron que por muchos años varias naciones se pelearan la soberanía del lugar. El tratado antártico firmado en el año 1959 en Washington D.C.⁴, puso fin a todas las disputas territoriales generadas en torno a la Antártida. Con la firma del acuerdo los países participantes, pudieron incursionar en la Antártida solo y únicamente con intereses científicos⁵.

Este estudio, en el marco del Tratado Antártico, está dirigido a determinar la diversidad microbiana en el agua marina y el suelo de la isla Livingston, Antártida, mediante un acercamiento metagenómico utilizando la plataforma Illumina MiSeq, para identificar microorganismos procariotas y eucariotas que podrían ser

explorados en diversas aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación o la bioprospección.

OBJETIVOS

General

Determinar la diversidad procariota y eucariota proveniente de muestras de agua y sedimento marino de la isla Livingston, Antártida mediante un acercamiento metagenómico utilizando la plataforma Illumina MiSeq

Específicos

- Establecer la diversidad procariota presente en muestras de suelo y agua marina de la isla Livingston, Antártida, mediante el análisis de la región ARNr 16S y 18S.
- Relacionar la diversidad microbiana identificada con aspectos de la biotecnología, como bioprospección y biorremediación.

1. ANTECEDENTES

Para el desarrollo de la investigación en la Antártida, el escepticismo de pensar que el lugar menos habitado del mundo pueda contener algo interesante para estudiar, ha sido sin lugar a dudas una de las principales variables que ha dificultado el desarrollo de los diferentes procesos científicos, “los suelos superáridos de la Antártida han sido pensados durante mucho tiempo como poco portadores de microorganismos”⁶.

Dejando atrás este escepticismo y siguiendo el impulso de la investigación, muchos estudios desde el siglo pasado acerca del microambiente de la Antártida, han llegado a la conclusión que, a pesar del ambiente extremo, la capacidad de supervivencia de microorganismos aquí es muy alta. Comprobando esta premisa, se han aislado en la zona todo tipo de microorganismos desde los tradicionales ya conocidos, como nuevas especies que sorprenden a la comunidad científica^{1, 7, 8,10}.

En el caso de los hongos Menezes et al¹, identificaron y caracterizaron en noviembre de 2016 a *Antarctomyces pellizariae*, un ascomiceto aislado de muestras de suelo de la isla Robert, en la Antártica Austral. Held B et al, desarrollaron un estudio acerca del crecimiento de hongos implicados en la descomposición de la madera en la Isla Deception, una isla volcánica activa que hace parte de las islas Shetland del sur de la península Antártica, a las cuales pertenece también la isla Livingston, y las principales especies encontradas en el estudio fueron del género *Cadophora*⁷.

En el 2016, el equipo de investigación coreano de Parka et al, descubrió e identificó en muestras de suelo antártico de la isla George, isla perteneciente a las islas Shetland del sur al igual que la isla Livingston, la especie ciliada *Pseudonotothymena antártica* n. g., n. s⁸.

Para el estudio de los procariotas, el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S ha sido evaluado por metagenómica en muestras de todo tipo, en investigaciones de la Antártida una de las referencias más particulares que se encontró fue un estudio de comunidades microbianas que habitaban el intestino de 4 especies de peces, un hecho verdaderamente particular de la investigación radica en que estas especies influyen de manera fundamental en varias características fisiológicas de los peces, que incluyen hasta su adaptación al ambiente de la Antártida⁹.

Con el ARNr 16S, se han encontrado también nuevas especies de géneros muy conocidos, tal es el caso de las *Pseudomonas*, la especie *P. Versuta* fue descrita y aislada por See-Too et al¹⁰ en enero del 2017 en muestras de suelo de la Antártida. Los filos Proteobacteria, Actinobacteria, y Firmicutes fueron los grupos dominantes encontrados en un análisis de las comunidades microbiológicas presentes en el Permafrost (suelo congelado), además encontraron muchas especies no cultivables a las que tuvieron que desarrollarle procedimientos de anabiosis (resucitación), el estudio requirió el uso de varias técnicas moleculares, como la Hibridación de Fluorescencia in Situ (FISH) y la pirosecuenciación¹¹.

Se han aislado en la Antártida genes que han otorgado a ciertos microorganismos la capacidad de sobrevivir en ambientes extremos tales como el gen *ICE-L* descubierto en *Chlamydomonas sp.* aislada de muestra de suelo de la Antártida, fue altamente expresado en un ensayo que sometía a la microalga a diferentes condiciones de temperatura y salinidad, demostrando la presunta participación de éste en todos los mecanismos de adaptabilidad a condiciones de estrés ambiental¹².

Factores actuales como el calentamiento global afectan de manera fundamental este tipo de ambientes, el permafrost que es el suelo congelado, regularmente se conoce como nieve, representa un ambiente extremo que cubre más del 25% de la Tierra¹³ y se ve sumamente afectado por el aumento de la temperatura y el consiguiente deshielo del mismo (permafrost). Investigaciones sobre este ecosistema han llevado a pensar que estos cambios climáticos probablemente darán lugar a la liberación de cantidades considerables de carbono y

nutrientes^{14,15}, así como gases de efecto invernadero¹⁶ y que probablemente esto se debe a que la descongelación puede renovar la actividad fisiológica de los microorganismos que han habitado este suelo y que por mucho tiempo, para este fin, han desarrollado adaptaciones fisiológicas, para ser capaces de colonizar y sobrevivir en ambientes extremadamente fríos¹⁴.

Comprobando esta afirmación, La Ferla et al, en el 2016, pudo constatar que el permafrost (550 cm de profundidad) de la tierra Victoria (Antártida) alberga una comunidad que es rica en células viables que poseen grandes capacidades metabólicas, así como intensos niveles de funcionalidad¹³.

Con respecto a la metagenómica, es un campo nuevo de la biología molecular que permite estudiar el conjunto de genomas presentes en muestras ambientales sin aislar y cultivar las especies. El ADN extraído directamente del ambiente fue inicialmente sugerido e implementado por Pace et al¹⁷ en el año 1985 y Schmidt et al¹⁸ en el año 1991, quienes construyeron 28 bibliotecas ambientales de ARNr 16S a partir de una muestra de plancton marino. Venter et al¹⁹ en 2004 iniciaron el proyecto denominado GOS (*Global Ocean Sampling Expedition*), que consistió en la exploración del genoma del océano con el objetivo de evaluar la diversidad genética en comunidades de la naturaleza. Gilbert et al, lideran el proyecto “El Microbioma Terrestre” (*The Earth Microbiome Project*), cuyo principal objetivo es entender las interacciones entre los microorganismos y sus ambientes, generando una base de datos global que permita acceder al consolidado de la diversidad microbiana del planeta²⁰.

2. MARCO REFERENCIAL

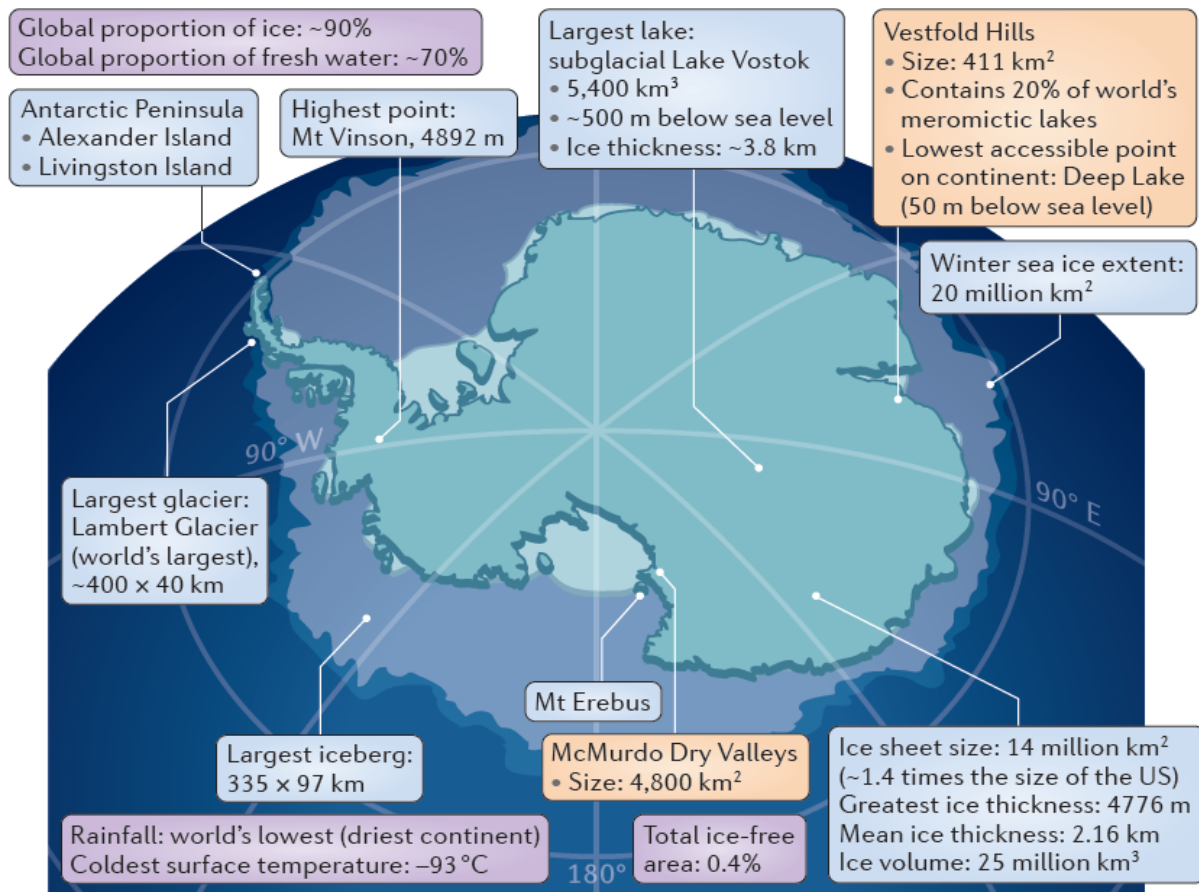
2.1 La Antártida

La Antártida o continente antártico también denominada Antártica en Chile, es el continente más austral de la Tierra, se sitúa en el hemisferio sur y el círculo polar Antártico, rodeada por el océano Antártico. El concepto de la Antártida o *Antártikos* se remonta a los griegos y surge por la suposición de la existencia de una tierra austral opuesta a las tierras del norte o *Ártikos*²¹.

La Antártida es el lugar más frío y seco de la Tierra¹², cerca del 98 % de la superficie está cubierta de hielo, tiene la altitud media más alta de todos los continentes, registra una temperatura alrededor de los 80°C bajo cero durante el invierno y durante el verano suelen estar alrededor de los cero grados²².

La Antártida representa ~90% de la proporción global de hielo. El área de la capa de hielo en el continente es ~14 millones de km² y en invierno esta área puede expandirse a ~20 millones de km². El espesor promedio del hielo es 2.16 km. En total, el volumen de hielo de la Antártida es ~25 millones de km³. Notablemente, solo ~0.4% del área del continente no tiene hielo. La Antártida tiene la precipitación pluvial más baja del mundo y la temperatura de la superficie más fría registrada es de -93 °C²³. En el mapa de la figura 1 se indica la ubicación de varios sitios en el continente, incluida la Península Antártica, Monte Vinson (punto más alto de la Antártida, 4892 m), el lago subglacial Vostok (lago más grande de la Antártida, volumen de 5.400 km³, ~500 m por debajo del nivel del mar, espesor del hielo ~ 3.8 km), Vestfold Hills, Deep Lake, a 50 m bajo el nivel del mar), el glaciar Lambert (glaciar más grande del mundo, ~ 400 km × 40 km), el Monte Erebus, y los valles secos de McMurdo (4,800 km²)²³.

Figura 1. Características geológicas y geográficas de la Antártida.



Fuente: Cavicchioli R. *Microbial ecology of Antarctic aquatic systems.* *Nature Reviews. Microbiology* 2015 Nov 1;13(11):691-706.

2.1.1 Historia

Antiguamente era conocida como *La Terra Australis* (la Tierra Desconocida del Sur). Por primera vez, en 1773, el Capitán James Cook se acercó a un poco más de 100 kilómetros de la cosa antártica²⁴. En 1820, los buques de tres hombres divisaron la Antártida, entre ellos el explorador ruso Fabian Gottlieb von Bellingshausen (un capitán de la Armada Imperial Rusa), Edward Banfield y Nathaniel Palmer. La expedición alcanzó un punto dentro de 32 kilómetros de la Tierra de la Reina Maud y registró la visión de una barra de hielo gigante conocida

como la barrera de hielo Fimbul. Sin embargo, no fue sino hasta 1821 cuando se documentó el primer desembarco llevado a cabo por el capitán estadounidense John Davis en la bahía de Hughes, cerca del Cabo Charles²⁵.

En 1840, miembros de la tripulación de la expedición de Jules Dumont D'Urville (1837-1840) desembarcaron a unos kilómetros cerca del cabo *Géodésie* en la costa de Tierra Adelia, donde tomaron muestras de minerales, algas y animales²⁶.

Los descubrimientos de la Antártida llevaron a numerosas controversias territoriales. Las distintas nomenclaturas geográficas no eran más que una expresión de las presiones de los estados por ejercer su influencia en el nuevo continente, principalmente en el área peninsular. De esta manera, esta pequeña franja de tierra antártica fue llamada "*tierra de O'Higgins*" por los chilenos y "*tierra San Martín*" por los argentinos. Por su parte, los ingleses la denominaron "*tierra de Graham*" y los estadounidenses "*península de Palmer*"²³.

2.2 Isla Livingston

La isla Livingston es una isla Antártica, que pertenece a las islas *Shetland* del Sur, ubicadas geográficamente en la Antártida occidental²⁷ (ver figura 2).

Figura 2. Ubicación geográfica de la isla Livingston.



Fuente: Autoras. **Adaptado de:** Cavicchioli R. *Microbial ecology of Antarctic aquatic systems. Nature Reviews. Microbiology* 2015 Nov 1; 13(11):691-706.

La isla Livingston es la segunda en superficie de las islas Shetland del Sur (974 km²), después de la isla Rey Jorge (1150 km²), mide en promedio 73 km de largo por 34 km de ancho. Su relieve es muy irregular con costas altas e inaccesibles²⁹. Las islas Shetland del Sur cubren una superficie total de 3.687 kilómetros que comprende de este a oeste 11 islas (ver figura 3), así como numerosos islotes y rocas más pequeños²⁸.

Figura 3. Mapa Político de las Islas Shetland del Sur.



Fuente: Merino H. Expedición Científica en las Shetland del Sur. Revista enfoque. 2015. [Citado 16 julio 2018]. Disponible en: <https://www.revistaenfoque.cl/expedicion-cientifica-en-las-shetland-del-sur>

2.3 Tratado Antártico

El tratado Antártico, se le conoce al acuerdo firmado el 1 de diciembre del año 1959 en Washington D.C, por los 12 países que en la época peleaban la soberanía por este continente. El tratado designó a la Antártica como una región de paz y cooperación, abordando además las cuestiones relacionadas con los

reclamos de soberanía; establece que “en interés de toda la humanidad, la Antártica continúe utilizándose siempre exclusivamente para fines pacíficos y que no llegue a ser escenario u objeto de discordia internacional”⁵.

Con la firma del acuerdo, se congeló la disputa territorial por la Antártida, los países participantes pudieron incursionar solo y únicamente con intereses científicos, conformando el comité especial para las investigaciones Antárticas que buscaba intercambiar información científica entre sus miembros sobre la Antártida⁴.

Los países participantes fueron inicialmente Argentina, Australia, Bélgica, Chile, Estados Unidos, Francia, Japón, Noruega, Nueva Zelanda, el Reino Unido, Sudáfrica y la Unión Soviética, a estas naciones se le conoce como los signatarios originales, pues el tratado dejó la puerta abierta a cualquier miembro de la Organización de las Naciones Unidas. Actualmente son 53 países los que hacen parte del Comité para la Investigación de la Antártida (SCAR por sus siglas en inglés), 29 de ellos poseen la categoría de «miembros consultivos», que les otorga plenos derechos decisorios, los 24 restantes son considerados «miembros adherentes», por lo cual no gozan del derecho a votar⁴ (ver anexo 1).

Aunque el tratado se firmó en el año 1959, entró en vigor solo hasta el 23 de junio de 1961 al depositarse el último de los instrumentos de ratificación de los 12 signatarios originales. El Gobierno de los Estados Unidos de América es el depositario del tratado, mientras que la sede permanente de la Secretaría del Tratado Antártico está situada en la ciudad de Buenos Aires, Argentina desde su creación en 2004⁴.

2.3.1 Tratado Antártico Colombia

Colombia ratificó su intención de realizar cooperación científica, proteger el ecosistema antártico y acceder a la condición de Parte Consultiva del tratado antártico a través de la Ley 67 del año 1988³⁰, con lo cual podrá tener voz y voto cuando a futuro se decida sobre asuntos antárticos que afectarán a la población y territorio colombianos³¹.

Para lograr esta meta, Colombia debe demostrarle a la comunidad internacional su interés en participar activamente en las investigaciones que se desarrollan en diferentes campos, con el fin de conocer, proteger y monitorear la Antártida, así como los procesos que la afectan, en especial aquellos derivados del calentamiento global³¹.

En el año 1990 se creó la Comisión Nacional para Asuntos Antárticos (CNAA) como órgano asesor del Gobierno Nacional para esta materia. Así mismo, en el año 2012 se designó a la Comisión Colombiana de Oceanografía, hoy Comisión Colombiana del Océano (CCO) y a la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ACCEFYN) como los organismos encargados de la planeación y coordinación de los programas y proyectos de Colombia en el Continente Antártico³². En miras de estos objetivos en el año 2013, se construyó la Agenda Científica Antártica de Colombia 2014-2035 y se estableció el Programa Antártico Colombiano (PAC)

Cumpliendo la agenda del programa Antártico Colombia se han realizado a la fecha cuatro expediciones lideradas por la Armada Nacional de Colombia y la Comisión Colombiana del océano (ver tabla 1).

Tabla 1. *Expediciones realizadas en marco del programa antártico de Colombia*

EXPEDICIÓN	AÑO DE REALIZACIÓN VERANO AUSTRAL	NÚMERO DE ENTIDADES PARTICIPANTES	NÚMERO DE INVESTIGADORES	NÚMERO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
I "Expedición Caldas"	2014-2015	21	20	9
II "Almirante Lemaitre"	2015-2016	16	24	15
III "Almirante Padilla"	2016- 2017	26	48	34
IV "Almirante Tono"	2017 -2018	23	41	25

En la tabla se describe las características, respecto al trabajo investigativo en las 4 expediciones, se resalta con color azul la III expedición, la expedición de la cual hace parte este proyecto.

2.4 III Expedición Científica de Colombia a la Antártica “Almirante Padilla” Verano Austral 2016 – 2017

La III expedición de Colombia a la Antártida zarpó de Cartagena de Indias el 16 de diciembre de 2016, a bordo del buque ARC 20 de Julio (figura 5) regresando al mismo puerto el 1 de marzo del 2017. Recorrió 4.682 millas náuticas hasta Punta Arenas³³.

Figura 4. Buque ARC 20 de Julio



Fuente: Armada Nacional de Colombia [Internet] Buque ARC “20 de Julio” finaliza su expedición 2017 a la Antártida. 2017. [citado 16 May 2018]. Disponible en: <http://www.ats.aq/s/ats.htm> <https://www.armada.mil.co/es/content/buque-arc-20-de-julio-finaliza-su-expedicion-2017-la-antartida>

2.5 Microorganismos de la Antártida

Los microorganismos que crecen a temperaturas tan bajas, que pueden llegar a los 0°C, como las de la Antártida, son denominados psicrófilos, hacen parte de los microorganismos extremófilos de bajas temperaturas, estos se clasifican como psicrotolerantes si crecen en temperaturas superiores 25°C, pero también a 15°C, y psicrófilos si crecen a temperaturas entre 10°C a 20°C, y menores a esta³⁴.

El habitar en condiciones donde el clima oscila por debajo de los 0°C, implica que los microorganismos han superado barreras como el transporte alterado de nutrientes, y fallas en los procesos del ciclo celular. La adaptación a bajas temperaturas se da gracias a la presencia de ácidos grasos insaturados, ramificados y de cadena corta, esta característica permite que la membrana celular se mantenga fluida a bajas temperaturas; la producción de proteínas intracelulares u otros compuestos crioprecipitados, permite la protección frente al congelamiento del citoplasma a temperaturas inferiores al punto de congelamiento del agua; la presencia de enzimas con mayor actividad específica que las de los microorganismos de zonas templadas, permiten una actividad metabólica adecuada a pesar de la baja energía térmica existente en el medio, y enzimas con menores interacciones entre cadenas laterales y mayor plasticidad del sitio activo, permiten la actividad de las enzimas a temperaturas bajas. Como consecuencia adicional, estas enzimas son extremadamente sensibles a temperaturas moderadas y generalmente dejan de actuar a 30-35°C³⁵.

Entre los microorganismos que logran adaptarse a estos nichos ecológicos extremos se encuentran miembros que hacen parte de los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya. Establecerse en este tipo de condiciones ambientales principalmente se debe a genes especiales, a mutaciones o polimorfismos genéticos, así como también a un llamado “Estado Criptobiotico”, que consiste en que cuando los recursos escasean, los microorganismos detienen las actividades metabólicas, conservándose viable a la espera de la disponibilidad del recurso escaso³⁴.

Más allá del interés académico por conocer este grupo de organismos, las propiedades biológicas de los psicrófilos y de las moléculas (enzimas, metabolitos secundarios, etc.) que producen, son de gran interés en diferentes campos de la microbiología industrial y la biotecnología³⁵.

Según estudios realizados durante las últimas décadas, dentro de los microorganismos más comúnmente encontrados tanto en suelos como en aguas antárticas, se encuentran:

Las Bacterias

- *Acinetobacter spp.*
- *Alicyclobacillus spp.*
- *Aquaspirillum spp.*
- *Arthrobacter spp.*
- *Azospirillum spp.*
- *Bacilo spp.*
- *Bizonia argentinensis sp. nov.*
- *Brevibacterium spp.*
- *Brevundimonas spp.*
- *Chryseobacterium spp.*
- *Corynebacterium spp.*
- *Flavobacterium spp.*
- *Gloeocapsa spp.*
- *Hymenobacter roseosalivarius*
- *Leptolyngbya frigida*
- *Massila spp.*
- *Micrococcus spp.*
- *Modestobacter multiseptatus*
- *Neisseria spp.*
- *Nocardia spp.*
- *Nostoc Comuna*

- *Paenibacillus* spp.
- *Planococcus* spp.
- *Pseudonocardia antarctica*
- *Pseudomonas* spp.
- *Psychrobacter* spp.
- *Sphingobacterium* spp.
- *Staphylococcus* spp.
- *Stenotrophomonas* spp.
- *Streptococcus* spp.
- *Streptomyces* spp.

Los Hongos

- *Alternaria* spp.
- *Antarctomyces psychotrophicus*
- *Arthrobotrys ferox*
- *Aspergillus* spp.
- *Aspergillus ustus*
- *Aureobasidium* spp.
- *Botryotrichum* spp.
- *Botrytis* spp.
- *Chaetomium gracile*
- *Cadophora* spp.
- *Cadophora malorum*
- *Cerrena unicolor*
- *Cladosporium* spp.
- *Cladosporium cladosporioides*
- *Cladosporium herbarum*
- *Cochliobolus heliconiae*
- *Coniochaeta ligniaria*

- *Curvularia inaequalis*
- *Debaryomyces ssp.*
- *Debaryomyces hansenii*
- *Geomyces spp.*
- *Geomyces pannorum* (Forma. *Chrysosporium pannorum*)
- *Geotrichum spp.*
- *Hohenbuehelia spp.*
- *Holwaya mucida*
- *Mortierella antarctica*
- *Mucor hiemalis*
- *Paecilomyces spp.*
- *Penicillium spp.*
- *Penicillium jensenii*
- *Penicillium swiecickii*
- *Phaeosphaeria spp.*
- *Phialophora spp.*
- *Phialophora fastigiata* (Forma. *Cadophora fastigiata*)
- *Phoma spp.*
- *Phoma herbarum*
- *Rhizopus spp.*
- *Rhizoscyphus ericae*
- *Staphylotrichum spp.*
- *Stereum hirsutum*
- *Stictis radiata*
- *Thelebolus microsporus*
- *Trichophyton eboreum*

Las Levaduras

- *Aureobasidium pullulans*

- *Candida spp.*
- *Cryptococcus spp.*
- *Debaryomyces hansenii*
- *Leucosporidium antarcticum*
- *Rhodotorula spp.*
- *Trichosporon spp.*

En aguas profundas es habitual encontrar gran diversidad de microorganismos pertenecientes al dominio Archaea, entre los cuales se destacan los géneros *Methanogenium* y *Methanococcus*³⁶. Adicionalmente, se ha evidenciado la presencia de las AFP en la secuenciación de los genomas completos de *Desulfotalea psychrophila*, *Colwellia psychrerythraea* 34H y *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, organismos encontrados en sedimentos marinos de bajas temperaturas.

2.6 Metagenómica

La definición esencial de la metagenómica es el análisis de ADN genómico a partir de toda una comunidad, lo que difiere de la genómica, que es el análisis de ADN genómico de un organismo o célula individual³⁶. En el sentido estricto, meta proviene del griego “más allá”, de ahí que el término significa literalmente “más allá del estudio del genoma” aplica un conjunto de tecnologías genómicas y herramientas bioinformáticas para acceder directamente al contenido genético de comunidades enteras de organismos³⁷.

El estudio de un metagenoma va encaminado al estudio de los genomas de microorganismos no cultivables, para comprender de una mejor manera la ecología microbiana de cualquier nicho ambiental, tales como aguas profundas, suelo, el ecosistema intestinal, biodigestores, aguas saladas, entre otros³⁷. La principal tarea de la metagenómica basada en la secuenciación es reconstruir el metabolismo de los organismos que componen la comunidad y predecir sus roles funcionales en el ecosistema, mediante las llamadas etiquetas de genes

ambientales, es decir, fragmentos de genes que codifican dominios conservados^{38,39}.

2.6.1 Historia de la Metagenómica

Los comienzos de la microbiología están estrechamente relacionados con la invención del microscopio. El primer registro en el que un ser humano logró observar una célula bacteriana se remonta a 1663, cuando Antonie van Leeuwenhoek observó bacterias de sus dientes a través de un microscopio casero. Los postulados de Robert Koch y la innovación en el desarrollo de medios de cultivo fueron fundamentales para que, a partir de 1880 hacia delante, el mundo microbiológico fuera prácticamente restringido a los tubos y placas de cultivo³⁶.

En 1985, la visualización del mundo microbiano fue cambiado radicalmente por el grupo de investigación de Woese, quienes identificaron al gen 16S ARNr como una molécula marcadora para evaluar la diversidad y la evolución microbiana⁴⁰.

El término “metagenómica” apareció en el año 1995, refiriéndose al análisis basado en las funciones del ADN de las especies en ambientes mixtos, el término inicialmente fue acuñado por Handelsman⁴¹. Sin embargo, un nuevo concepto y ahora más ampliamente aceptado se puede encontrar en los trabajos publicados en el 2004 por Venter et al¹⁹ que describen la aplicación de la secuenciación aleatoria para poblaciones microbianas. Estos primeros estudios han sido fundamentales tanto en la definición de la ruta a seguir en el futuro de las investigaciones en metagenómica, así como proporcionan un importante conocimiento sobre la magnitud y el esfuerzo que requiere la secuenciación y el análisis de la misma.

La metagenómica ha cambiado en los últimos 13 años, a partir de la secuenciación de fragmentos de ADN clonados utilizando la tecnología de Sanger hasta la aparición de la secuenciación de próxima generación (NGS)⁴¹.

2.7 Herramientas Bioinformáticas

2.7.1 Secuenciación de Próxima Generación (NGS)

La NGS, también llamada "secuenciación de alto rendimiento," es una colección de técnicas de secuenciación genética que mejoran el proceso de secuenciación original de Sanger. Entre diversos ejemplos se incluyen la secuenciación Illumina, la secuenciación Roche 454, la secuenciación Ion Torrent, Proton/PGM y la secuenciación SOLiD. Estos modos de secuenciación de ADN y ARN utilizan procesos paralelos masivos para trabajar de manera más rápida y rentable que el método Sanger⁴².

Además de reducir los costos y el tiempo para la secuenciación de ADN y ARN, la secuenciación de nueva generación también permite secuenciar con muestras más pequeñas. El tiempo y el esfuerzo necesarios para preparar las muestras también se reducen en comparación con la secuenciación de Sanger⁴³.

2.8 Región ARNr 16S

Propuesto por Pace y col¹⁷ en 1986, el ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S) fue presentado como un marcador molecular universal debido a que se encuentra en todos los organismos procariotas conocidos, se estableció su utilidad en estudios taxonómicos o de evolución y en la creación de bases de datos especializadas. En general, para que sea considerada como un marcador molecular, una región debe cumplir las siguientes características: contener una variabilidad y una diferencia genética significativa a nivel de especie; poseer sitios conservados contiguos, que permitan el diseño de iniciadores universales, para su amplificación por PCR; y tener una longitud adecuada que permita la extracción y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa. De hecho, existen proyectos fundamentales de referencia en relación a organismos procariotas: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, *The Prokaryotes* y *AllSpecies Living Tree Project*⁴⁴.

2.9 Región ARNr 18S

De manera equivalente a los genes ARNr 16S, el gen ARNr 18S eucariota presenta regiones conservadas y variables. Las secuencias del gen ARNr 18S y sus espacios internos transcritos (*Internal Transcribed Spacer* o ITS), son útiles en estudios filogenéticos e identificación taxonómica para clasificar hongos y eucariotas, así mismo es un marcador importante en el tamizaje de la biodiversidad ambiental⁴⁵.

En su contraparte, el ARNr 18S, adquiere mutaciones y es posible obtener información acerca de todos los organismos en una escala evolutiva. Sin embargo, los ARNr poseen suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos, y es posible diferenciar especies, cepas o variedades⁴⁶.

2.10 Unidades taxonómicas operacionales (OTU)

Las unidades taxonómicas operacionales se derivan de la agrupación del gen ARNr 16S y del gen ARNr 18S basadas en la similitud, es decir, el porcentaje de sitios que coinciden en una alineación de secuencia por pares. Desde el *cluster* OTU, se selecciona una secuencia única como referente y se utilizan como aproximaciones de taxones microbianos. El análisis basado en OTU ha permitido desarrollar plataformas bioinformáticas como QIIME para realizar todo el análisis de principio a fin⁴⁷.

2.11 Software Para Análisis Bioinformático

2.11.1 QIIME

Este software que por sus siglas traduce "conocimientos cuantitativos sobre ecología microbiana" es una fuente de código abierto que se utiliza para analizar e interpretar datos de secuencias de ácidos nucleicos de comunidades de hongos, virus, bacterias y arqueas, principalmente.

Ha sido fundamental en diferentes estudios para analizar datos de comunidades microbianas. Consiste en escribir una serie de comandos que si bien se pueden

modificar con necesidades únicas o preferencias por enfoques alternativos (por ejemplo, diferentes medidas entre la diversidad beta de la comunidad o diferentes bases de datos de referencia para la identificación taxonómica), este permite visualizar el resultado gráfico y textual.

QIIME es, por lo tanto, una plataforma sólida para combinar conjuntos de datos experimentales heterogéneos y obtener rápidamente nuevos conocimientos sobre diversas comunidades microbianas⁴⁸.

2.11.2 BLASTN

La herramienta básica de búsqueda de alineación local, es un programa de búsqueda de similitud de secuencias que se puede utilizar como una herramienta independiente a través de la web en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) o localmente en servidores de gran potencia que contengan las bases de datos. Existen varios tipos de BLAST para comparar todas las combinaciones de búsqueda de nucleótidos, proteínas o genomas con bases de datos de proteínas o nucleótidos. BLAST utiliza el método heurístico que encuentra similitudes cortas entre dos secuencias e intenta iniciar alineaciones⁴⁹.

2.12 Herramientas biotecnológicas

2.12.1 Bioprospección

Es la búsqueda de fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos que a partir de la información contenida en el material genético de los seres vivos son viables y poseen un potencial económico⁵⁰.

Esta información está contenida en los compuestos producidos por muchos seres vivos como medios de comunicación, defensa, e intercambio de información, a estos compuestos se les distingue de los compuestos responsables de las funciones primarias en los organismos, y se les conoce como metabolitos secundarios.

Estos metabolitos son diversos en cada especie, y esta información contenida es interesante en la industria farmacéutica, debido a que estos metabolitos bioactivos, han sido la fuente principal de muchos medicamentos. Así mismo, la posibilidad de intercambiar información genética de una especie a otra y la incorporación de genes de resistencia ha permitido mejorar los cultivos agrícolas e incrementar la productividad de los mismos⁵¹.

2.12.2 Biorremediación

La biorremediación, es una rama de la biotecnología ambiental, considerada actualmente como una tecnología alternativa que utiliza microorganismos o plantas para acumular, desintoxicar, degradar o eliminar los contaminantes ambientales.

Proporciona la transformación y/o incluso la eliminación de contaminantes orgánicos e inorgánicos, incluso a baja concentración. Aún se desconocen los mecanismos por los cuales los microorganismos y las plantas eliminan o transforman los contaminantes ambientales.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de investigación

Estudio cualitativo, de tipo descriptivo y experimental

3.2 Universo, población, muestra

3.2.1 Universo

Agua marina y sedimento marino tipo lodo de la Antártida.

3.2.2 Población

Agua marina y sedimento marino tipo lodo de las islas Shetland del Sur en la Antártida.

3.2.3 Muestra

Muestra de agua marina y sedimento marino tipo lodo de la isla Livingston Antártida, tomadas durante el verano austral 2016 - 2017 (Diciembre de 2016 a Marzo de 2017)

3.3 Hipótesis

En las muestras de agua marina y sedimento marinos tipo lodo seleccionadas de la isla Livingston Antártida, se encuentran especies procariotas y eucariotas no descritas anteriormente, y también especies ya descritas de las cuales se puede deducir su gran potencial biotecnológico, en aspectos como la bioprospección y la biorremediación.

3.4 Variables e indicadores

3.4.1 Variable independiente

ADN extraído muestras de Agua marina y sedimento marino tipo lodo de la isla Livingston Antártida.

3.4.2 Variable dependiente

Microorganismos identificados en las muestras de agua marina y sedimento marino tipo lodo de la isla Livingston Antártida.

3.4.3 Indicadores

Tabla 2. *Indicadores*

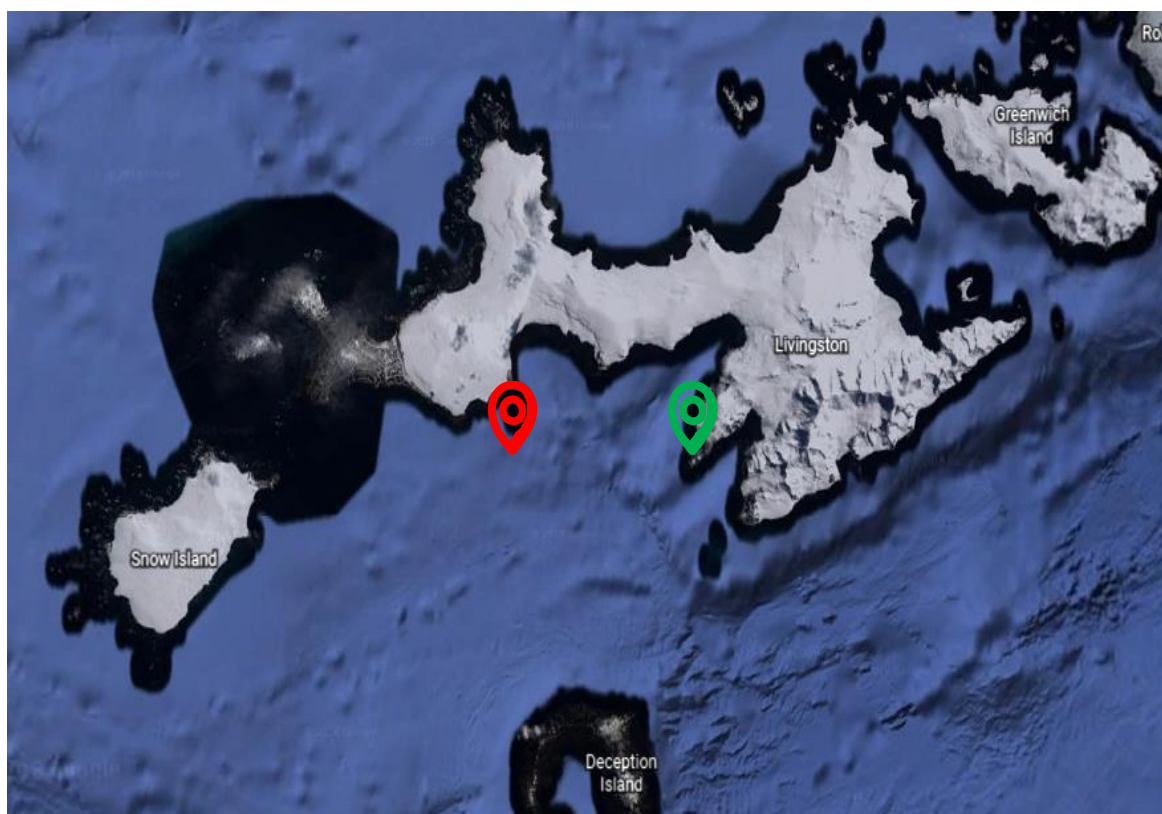
OBJETIVO	RESULTADO	INDICADOR
Establecer la diversidad procariota presente en muestras de agua y sedimentos marinos de la isla Livingston Antártida, mediante el análisis de la región ARNr 16S y 18S.	Diversidad procariota y eucariota identificados en las muestras de suelo y agua de la isla Livingston.	N° de organismos procariotas y eucariotas organizados en phylum, clase, orden, familia, género y especie identificadas en las muestras.
Relacionar la diversidad microbiana identificada en aspectos de la biotecnología, como bioprospección y la biorremediación.	Diversidad microbiana procariota y eucariota identificada, que puede estar relacionada con aspectos Biotecnológicos.	Reportes bibliográficos acerca de la correlación de los microorganismos encontrados con aspectos biotecnológicos como la bioprospección y la biorremediación.

3.5 Técnicas y procedimientos

3.5.1 Fase 1. Muestreo de agua y sedimentos marinos tipo lodo.

Muestreo de agua y sedimento marino tipo lodo en la isla Livingston Antártida (Figura 5), realizado en la III Expedición organizada por Colombia, la expedición Almirante Padilla, que tuvo lugar durante el verano austral 2016- 2017. El buque zarpo de Cartagena de indias el 16 de diciembre del 2016 y regreso el 1 de marzo del 2017, la expedición fue dirigida por la Armada Nacional de Colombia y la comisión Colombiana del Océano.

Figura 5. Vista satelital del muestreo en la isla Livingston, Antártida



Se observa señalado de color rojo la estación G12 y de color verde la estación DO1. Los dos puntos de muestreo tienen una distancia de 17 km.

Fuente: Adaptado de Google maps y Google earth

Tabla 3. Descripción del Muestreo

MUESTRA	ESTACIÓN	COORDENADAS	MÉTODO DE COLECTA	OBSERVACIONES
Agua Marina	G12*	-62.4042° S -60.4459° W	Botella roseta 30m de profundidad	5 ml
Sedimentos marino tipo lodo	D01*	-62.3922°S -60.2356°W	Draga 60m de profundidad	1000g

Nota* El prefijo G se refiere a la estación oceanográfica, y el prefijo D se refiere a la toma de sedimentos con draga

Las actividades a bordo del buque ARC 20 de Julio (Figura 4) permitieron articular con los proyectos “ICEMAN de DIMAR” y “BIOGERLACHE del INVEMAR” en la toma de muestras de sedimentos mediante el uso de draga schipek, así como la toma de muestras de agua marinas mediante roseta de botellas, instaladas en la Plataforma Móvil Oceanográfica-PMO (Figura 6).

Figura 6. Toma de muestras

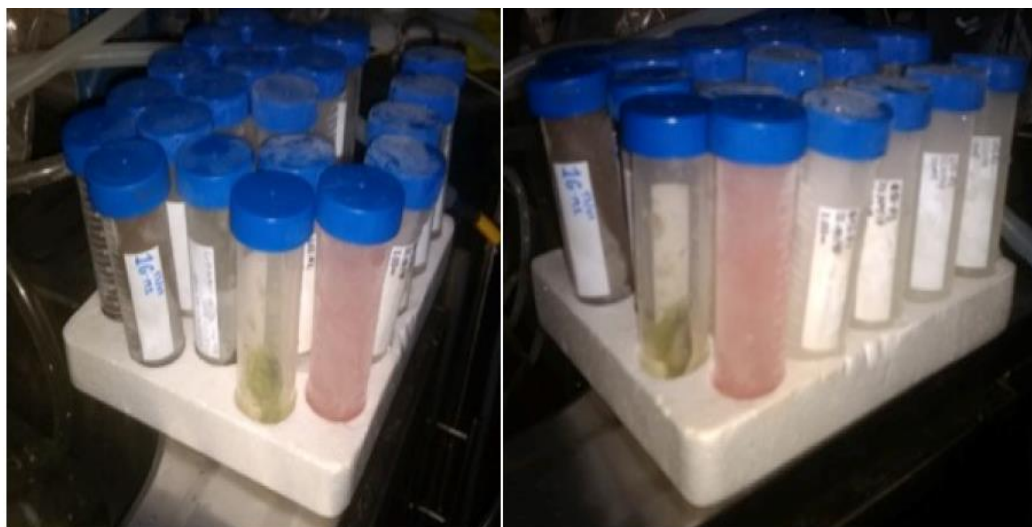


Izquierda apoyo grupo científicos a bordo buque ARC 20 de julio para toma de muestras de agua con roseta de botellas. **Derecha** apoyo grupo científicos a bordo buque ARC 20 de julio para toma de muestras sedimentos con draga.

Fuente: Torres P. Informe de la III Expedición Científica de Colombia a la Antártida “Almirante Padilla”, Verano Austral 2016-2017. ARC - ENAP – Dimar. Disponible en: <http://www.cco.gov.co/83-publicaciones/489-informe-de-la-iii-expedicion-de-colombia-a-la-antartida-almirante-padilla.html>

Todas las muestras (19 Muestras) fueron almacenadas en tubos plásticos tipo falcón de 50 ml y acopiadas en gradilla rotulada dentro del congelador a -4°C en el Laboratorio Móvil Oceanográfico-LMO de la DIMAR a bordo del buque ARC 20 de Julio para su transporte hasta Cartagena y Bogotá (Figura 7).

Figura 7. Almacenamiento de muestras



Fuente: Torres P. Informe de la III Expedición Científica de Colombia a la Antártida “Almirante Padilla”, Verano Austral 2016-2017. ARC - ENAP – Dimar. Disponible en: <http://www.cco.gov.co/83-publicaciones/489-informe-de-la-iii-expedicion-de-colombia-a-la-antartida-almirante-padilla.html>

Una vez en Cartagena se manipularon las muestras sin perder la cadena de frío o congelación hasta su llegada a las instalaciones de la Universidad de la Sabana en Cajicá, posteriormente en las mismas condiciones las muestras escogidas para el desarrollo de este proyecto fueron transportadas hasta las instalaciones de la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

3.5.2. Fase 2: Filtración de la muestra de agua

Para realizar la extracción de ADN de la muestra de agua, previamente se requirió hacer uso de la técnica de filtración por membrana, usando el equipo

malnifold (figura 8). Se ubicaron las membranas de celulosa, sobre la parte porosa del portafiltro, y se instaló sobre este el embudo.

Figura 8. Malnifol, equipo de filtración por membrana.



Fuente: Autoras

La muestra de agua se homogenizó y se depositó en el embudo sobre el portafiltro, posteriormente se aplicó el vacío mediante la bomba conectada al manifold abriendo completamente la llave. Al terminar la filtración, se cerró la llave y las membranas se tomaron con pinzas estériles, con tijeras estériles el papel filtro se cortó en trozos muy pequeños y estos se utilizaron para hacer la extracción de ADN.

3.5.3 Fase 3: Extracción de ADN

El ADN tanto de la muestra de agua como la de sedimento tipo lodo se extrajo utilizando el kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA), según las recomendaciones del fabricante (ver anexo 3). Como ya se mencionó en la fase 2 para la muestra de agua se utilizó el procedimiento de filtración por membrana, y a partir de las membranas de celulosa se realizó la extracción. Para la muestra de sedimento marino tipo lodo el procedimiento de extracción se realizó directamente de la muestra.

3.5.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Para conocer la calidad del ADN se realizó un ensayo de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, que se llevó a cabo en el termociclador Labnet “Multigene Optimax”, las condiciones de la PCR, y las características de los primers utilizados se muestran a continuación en la tabla 4, 5 y 6:

Tabla 4. Cálculos Master Mix

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN TOTAL
GoTaq® Green Master Mix PROMEGA CORPORATION.	2X	1X	7.5 µL
Primer ITS 1	10 µM	0.1µM	0.15 µL
Primer ITS 4	10 µM	0.1µM	0.15 µL
H₂O	--	--	5.2 µL
ADN	--	--	2 µL
VOLUMEN FINAL			15 µL

Tabla 5. Condiciones PCR

1	Desnaturalización inicial: 94°C 10 min
2	35-40 ciclos con desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 50°C por 1:30 min y extensión a 72°C por 2 min.
3	Extensión final a 72°C por 15 min

Se amplificaron los primers ITS1 e ITS4 descritos por White et al⁵³ en 1990. Estos primers amplifican secuencias altamente variables de ITS1 y ITS2, que rodean la secuencia de codificación 5.8S y se ubica entre la codificación de la subunidad pequeña y la secuencia de codificación de la subunidad grande del operon

ribosomal. Amplifican una amplia gama de dianas fúngicas y funciona muy bien para analizar ADN aislado.

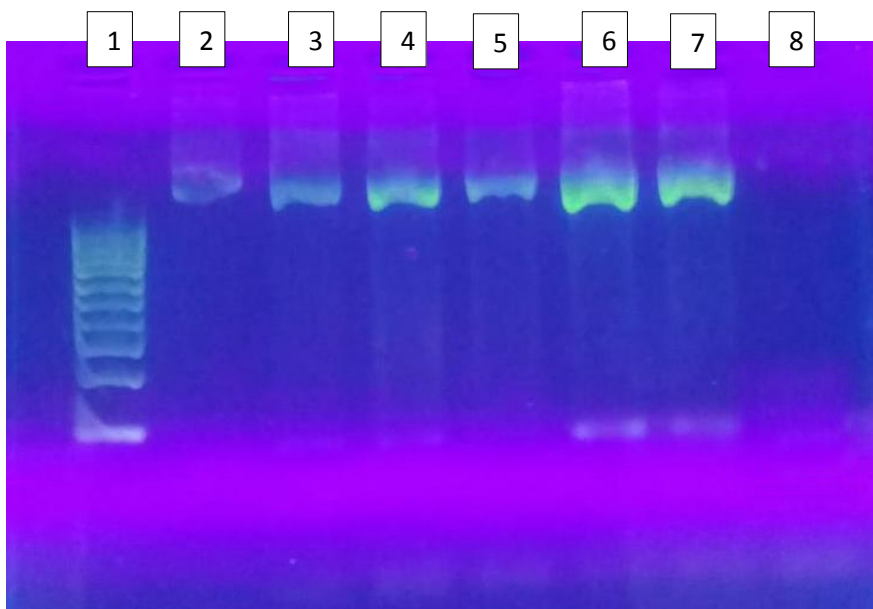
Tabla 6. PRIMERS PCR

Primer	Dirección	Secuencia (5'-3')
ITS1	Sentido	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	antisentido	TCCTCCGCTTATTGATATGC

3.5.3.2 Electroforesis en Gel de Agarosa

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain y corrido en buffer TAE 1X para observar los productos de PCR. (Se observaron fragmento aproximadamente de 500 a 700 pb, que era el tamaño esperado)

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa



Carril 1: Marcador de peso molecular (50 bp DNA Step Ladder).

Carril 2: Muestra de agua marina (NAX 1).

Carril 3: Extracción 1, Muestra de sedimento marino.

Carril 4: Extracción 2, Muestra de sedimento marino.

Carril 5: Extracción 3, Muestra de sedimento marino.

Carril 6: Extracción 4, Muestra de sedimento marino (NAX2.3)

Carril 7: Control Positivo.

Carril 8: Control Negativo.

3.5.3.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN, se hizo mediante el uso del NANODROP Thermo Scientific, ubicado en las instalaciones de la universidad de la Sabana.

Tabla 7. Concentración del ADN extraído de las muestras.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN
AGUA (NAX1)	34,9 ng/μl
SEDIMENTO (NAX2,1)	30,2 ng/μl
SEDIMENTO (NAX2,2)	37,9 ng/μl
SEDIMENTO (NAX2,3)	39 ng/μl
SEDIMENTO (NAX2,4)	41,3 ng/μl

La muestra de agua (NAX 1), y la de sedimento (NAX2.3) fueron llevadas a una concentración de 5ng/ μl, que fue la concentración exigida por la empresa Zymo Research, Irvine, CA, para realizar la secuenciación.

3.5.4 Fase 4: Secuenciación

El proceso de secuenciación, se realizó por la tecnología de próxima generación a través de la plataforma Illumina, en el secuenciador Illumina Mi Seq. El proceso incluyó los siguientes pasos:

-Preparación de la biblioteca 16S y 18S:

La librería de las muestras fueron preparadas como se describe en el protocolo de preparación de librerías de secuenciación para 16S y 18S metagenómica (Illumina Inc., San Diego, California, USA) con las siguientes modificaciones:

Para 16S, se utilizó el kit de preparación de la biblioteca NGS Quick-16S (Zymo Research, Irvine, CA). Los primers utilizados amplificaron la región variable V3-V4 del gen ARNr 16S (V3F y V4R) fueron descritos por Klindworth et al. 2013 (Tabla 8)⁵⁴.

Tabla 8. Primers utilizados para la amplificación de la región ARNr 16S

Primer	Dirección	Secuencia (5'-3')
V3F	Sentido	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCC TACGGGNGGCWGCAG
V4R	Antisentido	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTG ACTACHVGGGTATCTAATCC

Para 18S, se utilizó el kit de preparación de la biblioteca NGS Quick-18S (Zymo Research, Irvine, CA). Los primers utilizados amplificaron la región variable V4-V5 del gen ARNr 18S (F-566 y R-1200), fueron descritos por Hadziavdic et al. En 2014 (Tabla 9)⁵⁵.

Tabla 9. Primers utilizados para la amplificación de la región ARNr 18S

Primer	Dirección	Secuencia (5'-3')
F-566	Sentido	CAG CAG CCG CGG TAA TTC C
R-1200	Antisentido	CCC GTG TTG AGT CAA ATT AAG C

La biblioteca de secuenciación, tanto para 16S como para 18S, se preparó realizando ensayos de PCR en tiempo real para controlar ciclos y, por lo tanto, evitar la formación de quimeras de PCR. Los productos finales de PCR se cuantificaron con lecturas de fluorescencia (qPCR). Después de la PCR, se realizó la limpieza de la librería usando Selecta Size DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA). La calidad de las librerías terminadas se verificó con Agilent DNA1000 chip y se cuantificaron con TapeStation Instruments® y Qubit®.

Las librerías fueron estandarizadas a 2µM y mezcladas antes del proceso de secuenciación.

Fase 5. Análisis bioinformático

Mediante algoritmo Dada2, se eliminaron secuencias que probablemente se generaron por errores de secuenciación, se identificaron secuencias potencialmente quiméricas, las cuales fueron posteriormente eliminadas.

Mediante el programa QIIME v.1.9.1.se llevó a cabo el agrupamiento de las secuencias en OTUs con un 97% de similitud entre estas, y posteriormente se realizó la clasificación taxonómica de los OTUs.

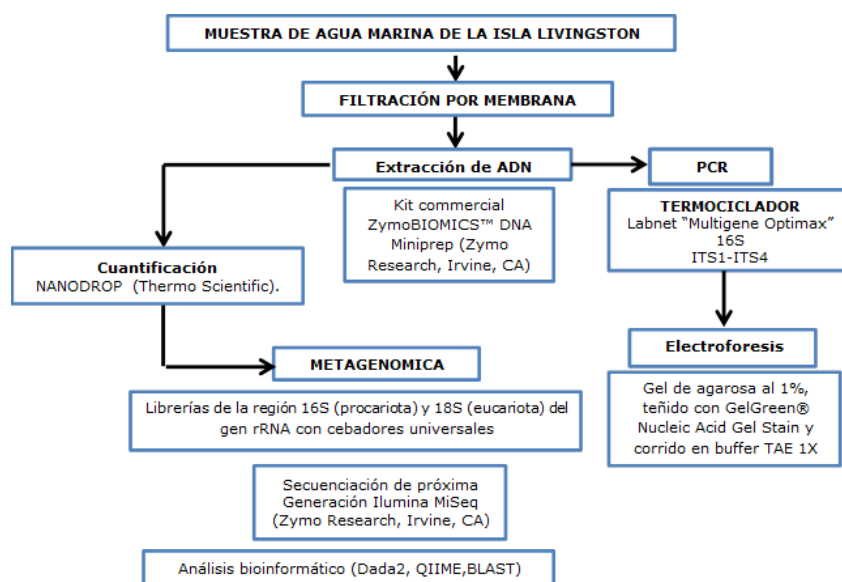
Se realizó el alineamiento de las secuencias con la base de datos GenBank con el fin de hacer la clasificación taxonómicamente a través del algoritmo BLASTN.

Análisis de la diversidad microbiana

Debido a que se obtuvieron 2 grupos de datos, producto de la secuenciación de 2 extracciones de ADN de 2 diferentes muestras se realizaron los diferentes análisis de diversidad alfa, con el fin de observar los cambios en las comunidades dentro de cada muestra.

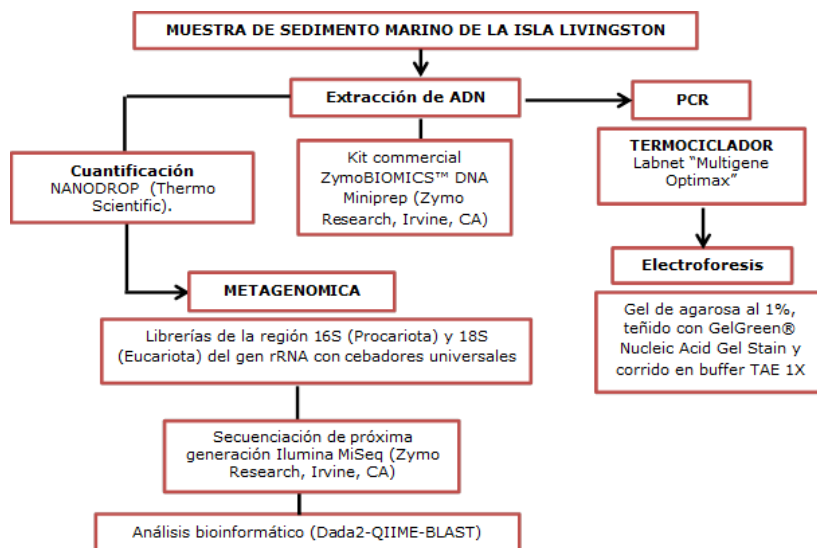
En las figuras 10 y 11, se observa el resumen de procedimiento para ambas muestras.

Figura 10. Resumen procedimiento para metagenomica de muestra de agua marina.



Fuente: Autoras

Figura 11. Resumen procedimiento para metagenomica de muestra de sedimento marino.



Fuente: Autoras

4. RESULTADOS

4.1 Análisis metagenómico del gen ARNr 16S

Tabla 10. Secuencias obtenidas durante el procesamiento metagenómico del ARNr 16S

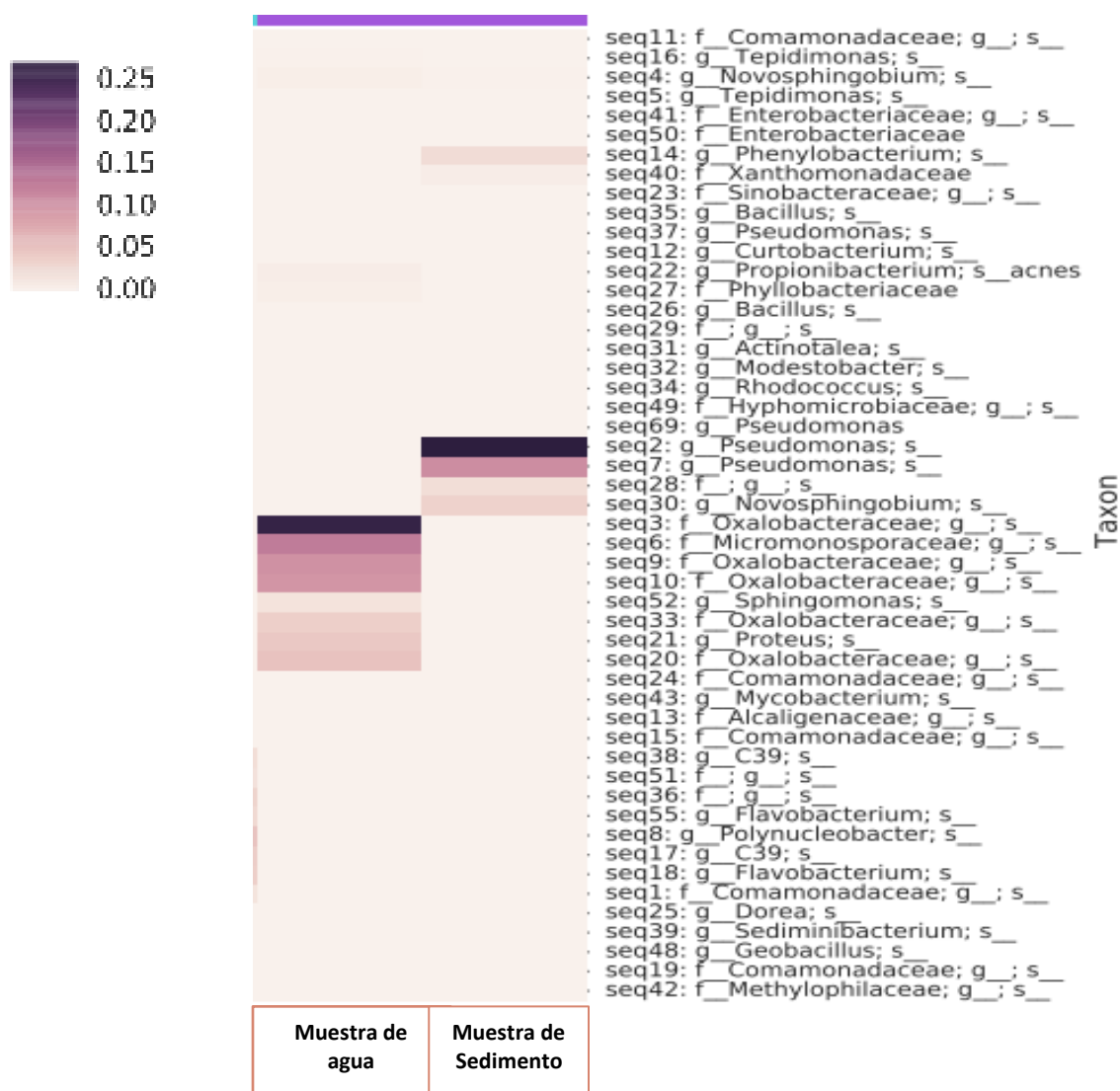
Muestra	Secuencias crudas	Secuencias recortadas	Análisis DADA2	Secuencias quiméricas	Secuencias libres de secuencias quiméricas	Secuencias únicas	Secuencias después de la filtración de tamaño	OTUs
Agua Marina	116996	98010	48614	486	48128	55	48128	55
Sedimento marino	127394	114258	56043	695	55348	235	54783	190
TOTAL	244390	212268	160700	1181	103476	290	102911	245

Tabla 11. OTU identificadas y no identificadas durante el procesamiento metagenómico del ARNr 16S

Muestras	OTU	OTU identificadas						OTU no identificadas
		Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	
Agua Marina	55	5	11	21	35	18	1	20
Sedimento marino	190	9	24	45	71	47	12	119

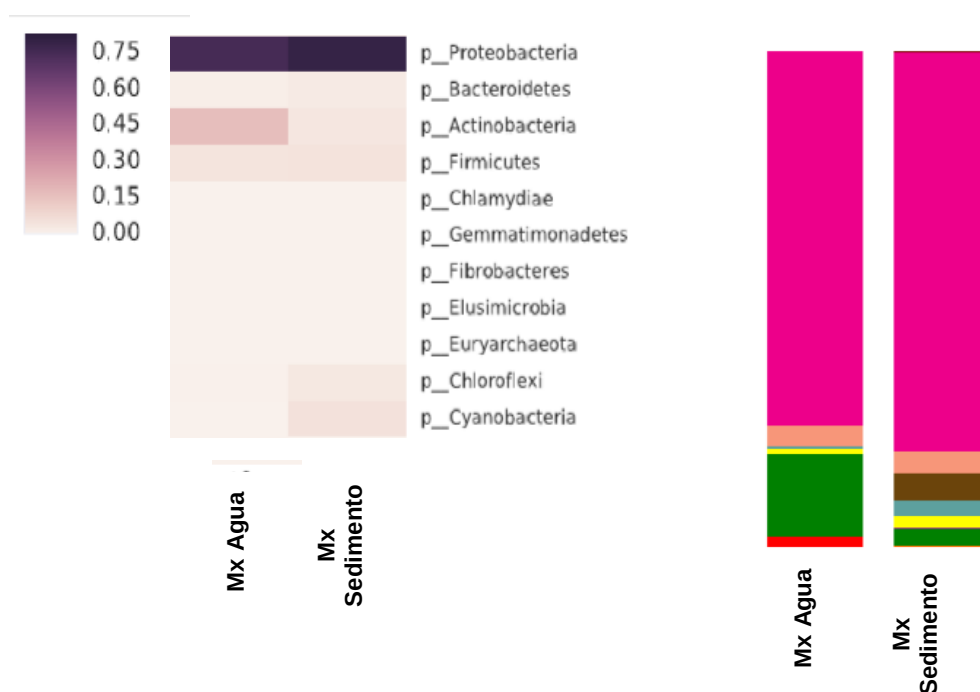
El análisis metagenómico del gen ARNr 16S, mostro en mayor abundancia para la muestra de agua marina, la secuencia 3, que se reconoció como la familia Oxalobacteriaceae, y para la muestra de sedimento marino, la secuencia encontrada en mayor abundancia, la secuencia 2 corresponde al género *speudomonas*, como se puede observar en la figura 12.

Figura 12. Mapa de calor de abundancia de secuencias encontradas en el análisis el gen ARNr 16S.



La caracterización metagenómica dirigida al 16S indicó predominancia a nivel del filo Proteobacteria (75.5% para la muestra de agua y 80.3% para la muestra de sedimento marino tipo lodo), Actinobacteria (16.6% para la muestra de agua y 3.6% para la muestra de sedimento marino tipo lodo), Firmicutes (4.2% para la muestra de agua y 4.5% para la muestra de sedimento marino tipo lodo) y Cyanobacteria (Figura 13).

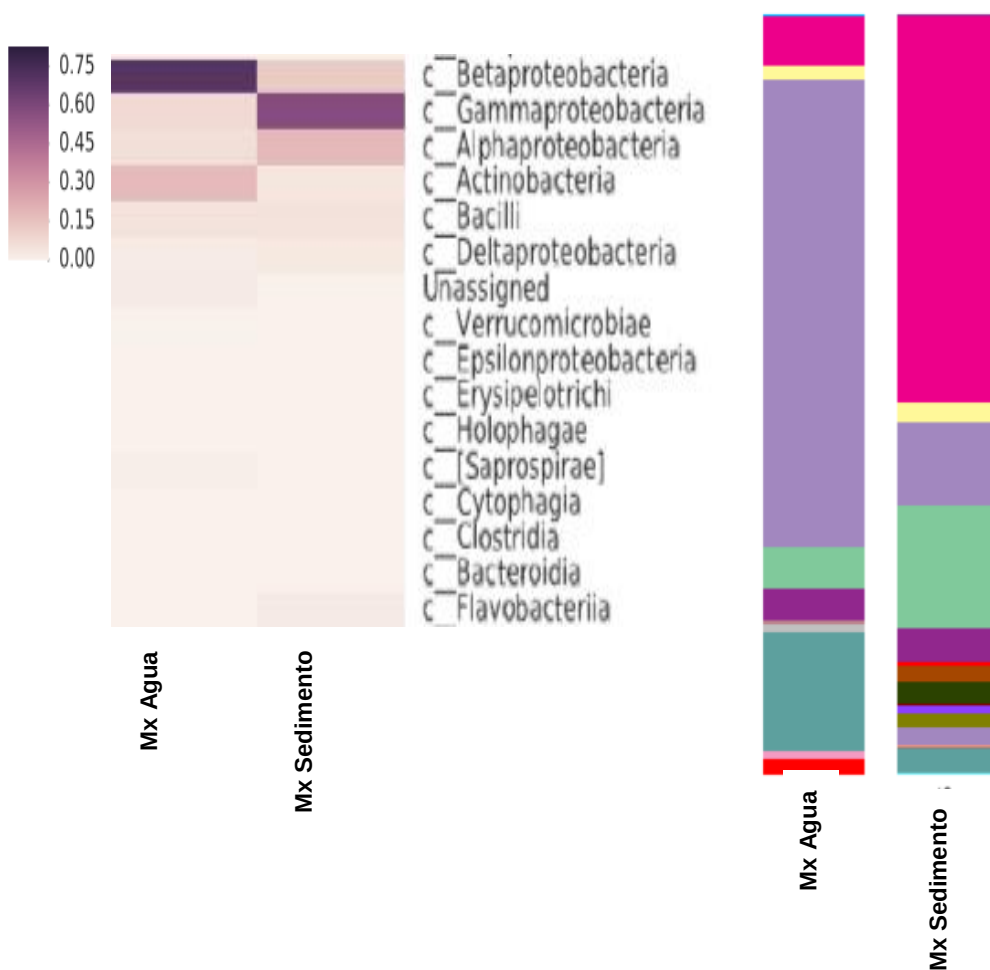
Figura 13. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición a nivel de filo (derecha).



		Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
Legend	Taxonomy	%	%
	Unassigned;Other	2.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria	16.6%	3.6%
	k_Bacteria;p_Armatimonadetes	0.0%	0.2%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes	1.1%	2.4%
	k_Bacteria;p_Chloroflexi	0.5%	3.2%
	k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0.0%	5.3%
	k_Bacteria;p_Firmicutes	4.2%	4.5%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria	75.5%	80.3%
	k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	0.0%	0.2%
	k_Bacteria;p_Thermi	0.0%	0.2%

A nivel de clase, la comunidad microbiana presentó alta abundancia por Betaproteobacteria (61.7% para la muestra de agua y 10.9% para la muestra de sedimento marino tipo lodo), Gammaproteobacteria (6.6% para la muestra de agua y 50.8% para la muestra de sedimento marino tipo lodo), Alphaproteobacteria (5.4% para la muestra de agua y 16.0 % para la muestra de sedimento marino tipo lodo), Actino-bacteria (15.6 % para la muestra de agua y 3.2% para la muestra de sedimento marino tipo lodo) y Bacilli (4.2% para la muestra de agua y 4.4 % para la muestra de sedimento marino tipo lodo) (Figura 14).

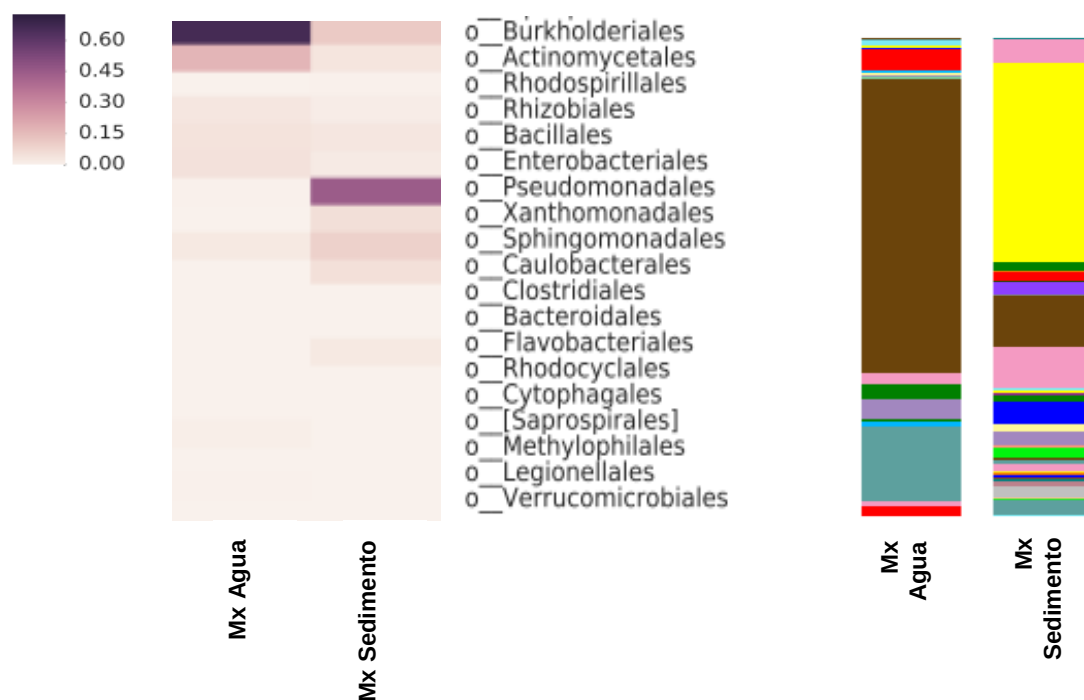
Figura 14. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición a nivel de clase (derecha).



Legend	CLASE	Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
		%	%
	Unassigned;Other;Other	2.1%	0.1%
	Acidimicrobiia	1.0%	0.1%
	Actinobacteria	15.6%	3.2%
	Thermoleophilia	0.0%	0.2%
	Chthonomonadetes	0.0%	0.2%
	Cytophagia	0.0%	0.1%
	Flavobacteriia	0.0%	2.2%
	Sphingobacteriia	0.1%	0.1%
	Saprospirae	1.0%	0.1%
	Anaerolineae	0.0%	1.7%
	BacterChloroflexi	0.0%	1.1%
	Ellin6529	0.5%	0.0%
	Gitt-GS-136	0.0%	0.1%
	TK17	0.0%	0.2%
	Chloroplast	0.0%	2.8%
	Nostocophycideae	0.0%	2.1%
	Synechococcophycideae	0.0%	0.4%
	Bacilli	4.2%	4.4%
	Clostridia	0.0%	0.1%
	Alphaproteobacteria	5.4%	16.0%
	Betaproteobacteria	61.7%	10.9%
	Deltaproteobacteria	1.7%	2.5%
	Gammaproteobacteria	6.6%	50.8%
	Zetaproteobacteria	0.2%	0.0%
	Verrucomicrobiae	0.0%	0.1%
	Methylacidiphilae]	0.0%	0.1%
	Deinococci	0.0%	0.2%

A nivel de orden, predominaron Burkholderiales en la muestra de agua (61.7%), y Pseudomonadales en la muestra de sedimento marino tipo lodo (41.8%), Actinomycetales (15.6% y 3.2%), Sphingomonadales (2.2% y 8.7%), Bacillales (4.2% y 3.0%), y Enterobacteriales (4.5% y 1.8%), se encontraron en ambas muestras (figura 15).

Figura 15. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición a nivel de orden (derecha).

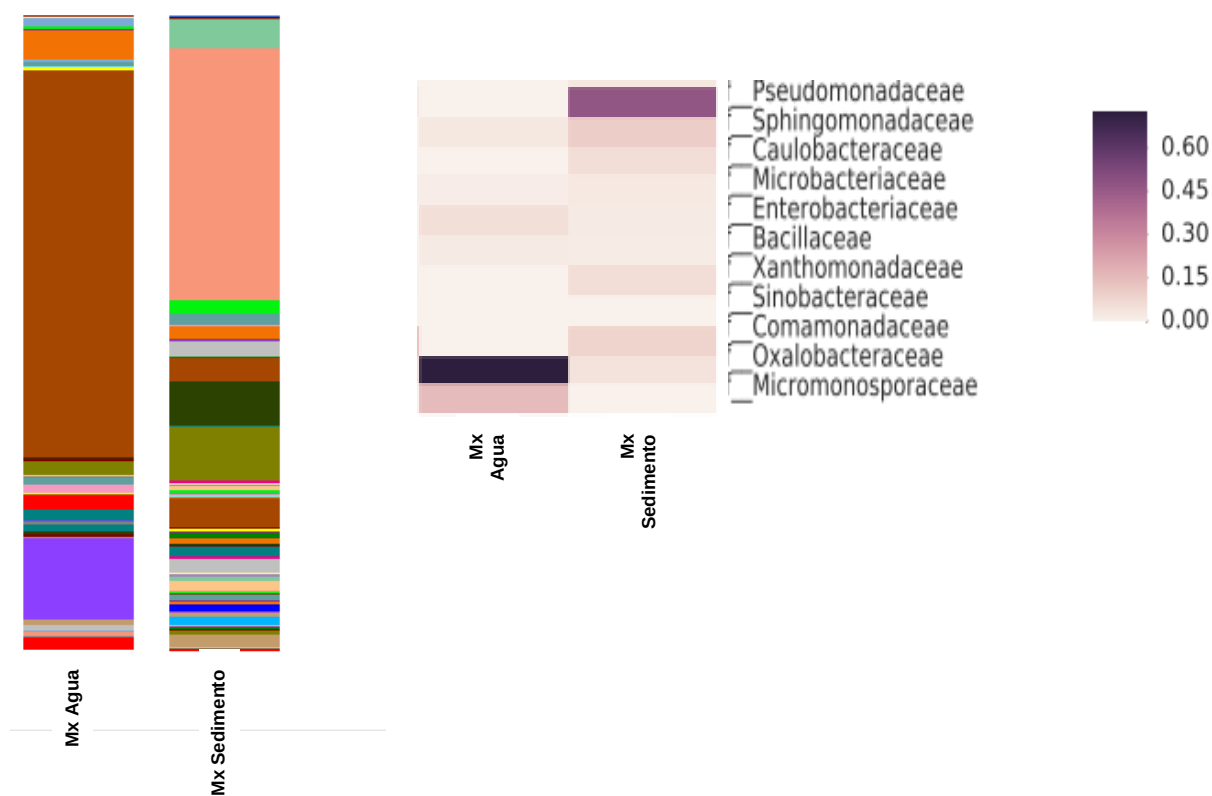


Legend	Taxonomy	Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
		%	%
	Unassigned;Other;Other;Other	2.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Acidimicrobiia;o_Acidimicrobiales	1.0%	0.1%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales	15.6%	3.2%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Sphingobacteriia;o_Sphingobacteriales	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_[Saprospirae];o_[Saprospirales]	1.0%	0.1%
	k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_Ellin6529;o_	0.5%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales	4.2%	3.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales	0.0%	1.5%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales	0.0%	0.1%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Caulobacteriales	0.1%	4.6%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales	3.0%	1.3%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacteriales	0.1%	0.7%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales	2.2%	8.7%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales	61.7%	10.8%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Myxococcales	0.0%	2.5%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Aeromonadales	0.0%	0.1%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Alteromonadales	0.0%	0.3%

	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales	4.5%	1.8%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Legionellales	0.3%	0.0%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Methylococcales	0.0%	0.2%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Oceanospirillales	0.0%	1.9%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pasteurellales	0.0%	0.1%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pseudomonadales	0.4%	41.8%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Thiotrichales	1.1%	0.0%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales	0.0%	4.8%

En cuanto a las familias, predominaron Oxalobacteraceae en la muestra de agua (61.8%), y Pseudomonadaceae en la muestra de sedimento marino tipo lodo (39.6%) (figura 16).

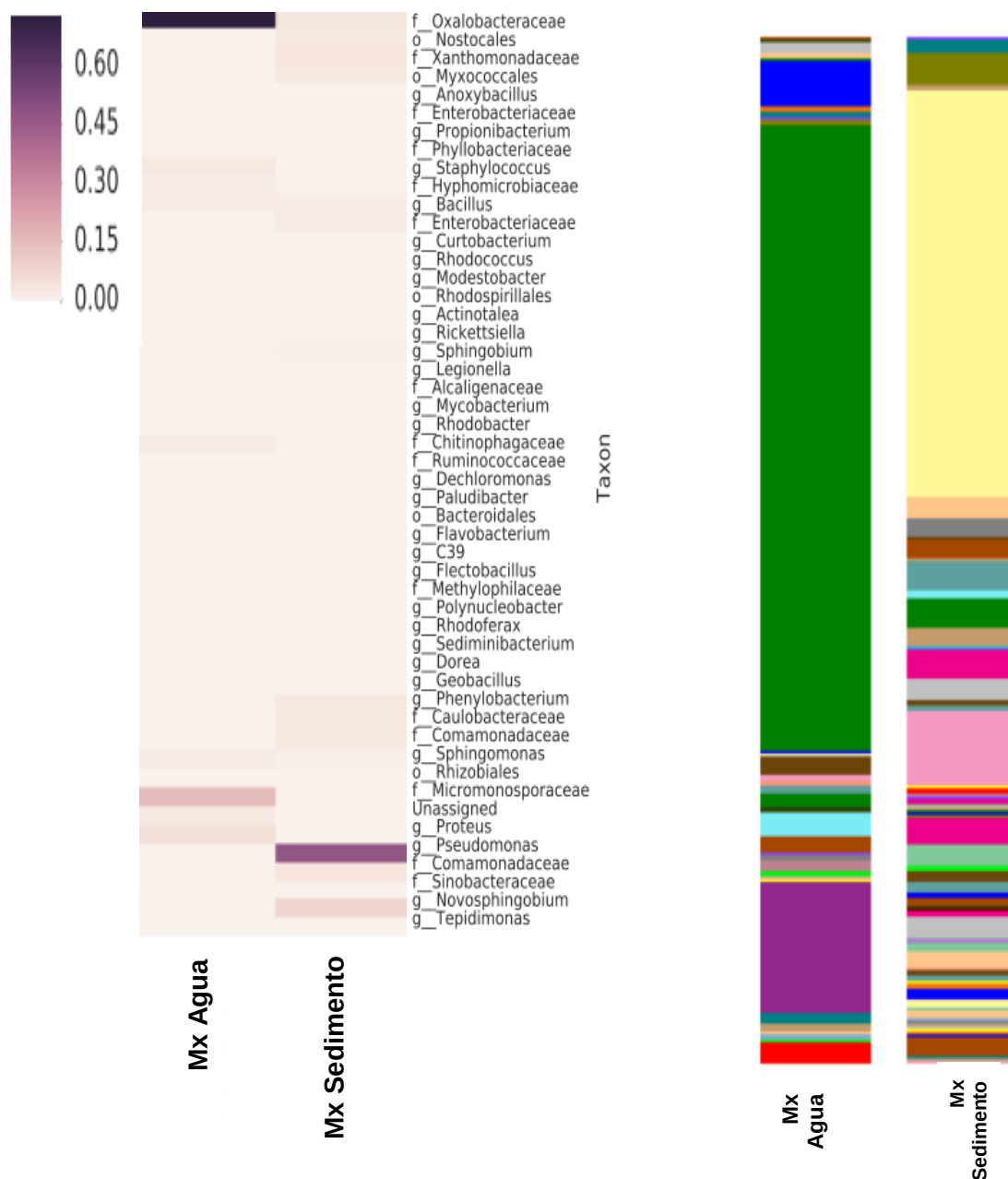
Figura 16. Mapa de calor de abundancia (derecha) y diagrama de composición a nivel de familia (izquierda).



Legend	Taxonomy	Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
		%	%
	Unassigned;Other;Other;Other;Other	2.1%	0.1%
	k Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales:f Micromonosporaceae	12.8%	0.0%
	k Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales:f Mycobacteriaceae	0.2%	0.1%
	k Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales:f Nocardiodiaceae	0.4%	0.1%
	k Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales:f Propionibacteriaceae	0.5%	0.1%
	k Bacteria;p Bacteroidetes;c Sphingobacteriia;o Sphingobacteriales:f	0.1%	0.0%
	k Bacteria;p Bacteroidetes;c Sphingobacteriia;o Sphingobacteriales:f Sphingobacteriaceae	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Bacteroidetes;c [Saprospirae];o [Saprospirales];f Chitinophagaceae	1.0%	0.1%
	k Bacteria;p Chloroflexi;c Anaerolineae;o Caldilineales:f Caldilineaceae	0.0%	1.1%
	k Bacteria;p Chloroflexi;c Anaerolineae;o H39:f	0.0%	0.4%
	k Bacteria;p Chloroflexi;c Ellin6529;o ;f	0.5%	0.0%
	k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;Other	0.2%	0.0%
	k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales:f Bacillaceae	1.8%	1.5%
	k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales:f Paenibacillaceae	0.0%	0.4%
	k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales:f Planococcaceae	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales:f Staphylococcaceae	2.3%	0.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Caulobacteriales:f Caulobacteraceae	0.1%	4.6%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;Other	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales:f	0.0%	0.2%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales:f Bradyrhizobiaceae	0.3%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales:f Brucellaceae	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales:f Hyphomicrobiaceae	1.3%	0.4%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales:f Methylobacteriaceae	0.9%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales:f Phyllobacteriaceae	0.4%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales:f Rhizobiaceae	0.0%	0.3%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodobacterales:f Rhodobacteraceae	0.1%	0.7%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales:f Acetobacteraceae	0.0%	0.2%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales:f Rhodospirillaceae	0.0%	0.2%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rickettsiales:f Pelagibacteraceae	0.0%	0.3%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales:f Sphingomonadaceae	2.2%	8.7%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales:f Alcaligenaceae	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales:f Burkholderiaceae	0.4%	0.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales:f Comamonadaceae	0.2%	7.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales:f Oxalobacteraceae	61.0%	3.8%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Methylophilales:f Methylophilaceae	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o ;f	0.5%	0.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Bdellovibrionales:f Bacteriovoracaceae	0.1%	0.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Desulfurculales:f Desulfurculaceae	0.6%	0.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Desulfuromonadales:f Desulfuromonadaceae	0.5%	0.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Deltaproteobacteria;o Myxococcales:f	0.0%	2.5%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Aeromonadales:f Aeromonadaceae	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Alteromonadales:f Alteromonadaceae	0.0%	0.2%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Alteromonadales:f Shewanellaceae	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales:f Enterobacteriaceae	4.5%	1.8%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Legionellales:f Coxiellaceae	0.3%	0.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Methylococcales:f Methylococcaceae	0.0%	0.2%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Oceanospirillales:f Oceanospirillaceae	0.0%	1.9%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pasteurellales:f Pasteurellaceae	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales:f Moraxellaceae	0.4%	2.1%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales:f Pseudomonadaceae	0.0%	39.6%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Thiotrichales:f Piscirickettsiaceae	1.1%	0.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales:f Xanthomonadaceae	0.0%	4.8%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o [Marinicellales];f [Marinicellaceae]	0.2%	0.0%
	k Bacteria;p Proteobacteria;c Zetaproteobacteria;o Mariprofundales:f Mariprofundaceae	0.2%	0.0%
	k Bacteria;p Verrucomicrobia;c Verrucomicrobiae;o Verrucomicrobiales:f Verrucomicrobiaceae	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p Verrucomicrobia;c [Methylacidiphilae];o Methylacidiphilales:f LD19	0.0%	0.1%
	k Bacteria;p [Thermi];c Deinococci;o Deinococcales:f Deinococcaceae	0.0%	0.2%

Los géneros más representativos en la muestra de sedimento marino tipo lodo, fueron *Pseudomonas* (39.6%), y *Novosphingobium* (7.3%). En la muestra de agua predominaron los géneros no identificados pertenecientes a las familias Oxalobacteriaceae (60.9%) y micromonosporaceae (12.8%)

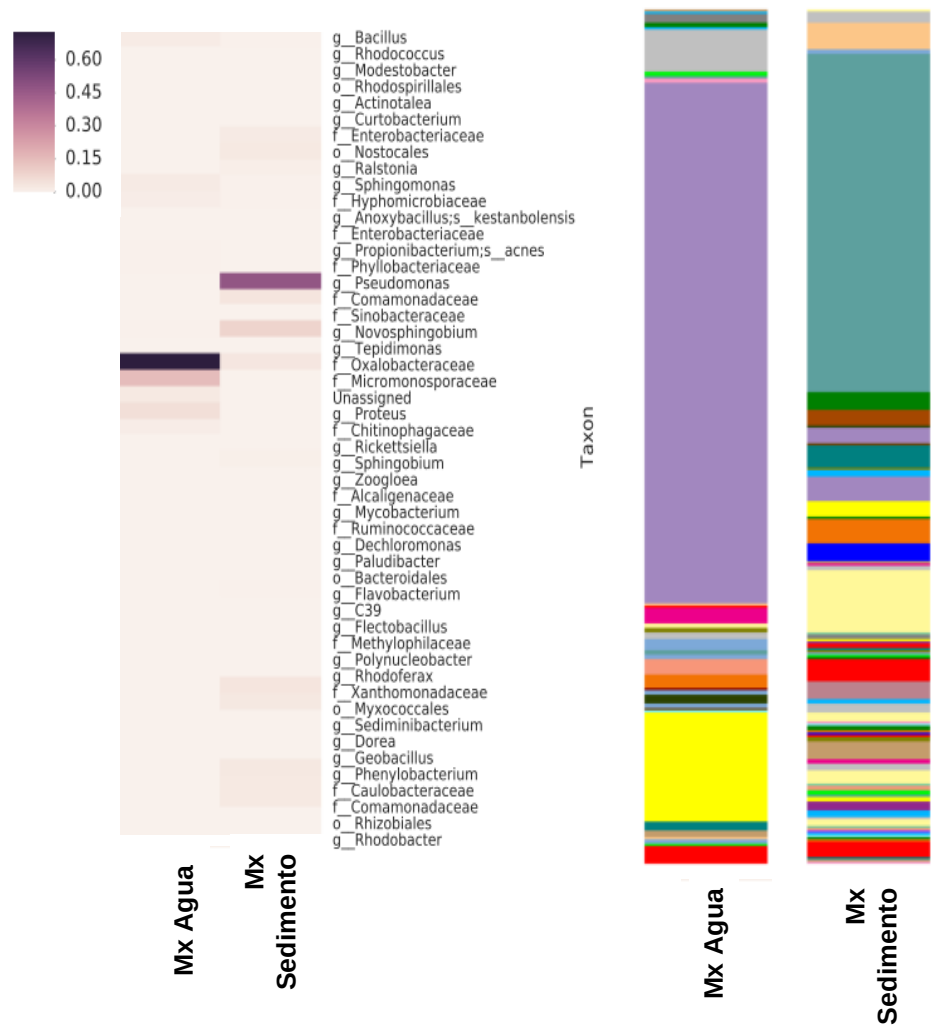
Figura 17. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición a nivel de género (derecha).



Legend	Taxonomy	Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
		%	%
	Unassigned;Other;Other;Other;Other;Other	2.1%	0.1%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micrococcaceae;g	0.0%	0.4%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micrococcaceae;g Renibacterium	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micromonosporaceae;g	12.8%	0.0%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodobacterales;f Rhodobacteraceae;g	0.0%	0.5%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodobacterales;f Rhodobacteraceae;g Loktanella	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodobacterales;f Rhodobacteraceae;g Rhodobacter	0.1%	0.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales;f Acetobacteraceae;g	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales;f Rhodospirillaceae;g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales;f Rhodospirillaceae;g Azospirillum	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rickettsiales;f Pelagibacteraceae;g	0.0%	0.3%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;g	0.0%	0.3%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;g Novosphingobium	0.4%	7.3%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;g Sphingobium	0.0%	0.6%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Sphingomonadales;f Sphingomonadaceae;g Sphingomonas	1.8%	0.5%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Alcaligenaceae;g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Burkholderiaceae;g Burkholderia	0.4%	0.0%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Comamonadaceae;Other	0.0%	2.0%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Comamonadaceae;g	0.0%	3.0%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Comamonadaceae;g Acidovorax	0.0%	0.3%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Comamonadaceae;g Delftia	0.0%	1.7%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Comamonadaceae;g Tepidimonas	0.2%	0.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Oxalobacteraceae;g	60.9%	2.8%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Oxalobacteraceae;g Janthinobacterium	0.1%	0.0%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Oxalobacteraceae;g Ralstonia	0.0%	0.9%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Methylophilales;f Methylophilaceae;g Methylothera	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f Moraxellaceae;g Acinetobacter	0.4%	2.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f Pseudomonadaceae;g Pseudomonas	0.0%	39.6%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Thiotrichales;f Piscirickettsiaceae;g	1.1%	0.0%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;Other	0.0%	0.5%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g	0.0%	3.0%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g Lysobacter	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Xanthomonadales;f Xanthomonadaceae;g Stenotrophomonas	0.0%	1.1%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o [Marinicellales];f [Marinicellaceae];g	0.2%	0.0%
k	Bacteria;p Proteobacteria;c Zetaproteobacteria;o Mariprofundales;f Mariprofundaceae;g Mariprofundus	0.2%	0.0%
k	Bacteria;p Verrucomicrobia;c Verrucomicrobiae;o Verrucomicrobiales;f Verrucomicrobiaceae;g Luteolibacter	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Verrucomicrobia;c [Methylophilales];o Methylophilales;f LD19;g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p [Thermi];c Deinococci;o Deinococcales;f Deinococcaceae;g Deinococcus	0.0%	0.2%

Las especies predominantes no fueron identificadas y pertenecen al género *Pseudomonas* (39.6%), en la muestra de sedimento marino tipo lodo y a la familia Oxalobacteriaceae en la muestra de agua (60.9%) (figura 18).

Figura 18. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición a nivel de especie (derecha).



Legend	Taxonomy	Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
		%	%
	Unassigned;Other;Other;Other;Other;Other;Other	2.1%	0.1%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Acidimicrobiia;o Acidimicrobiales;f EB1017;g ;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Acidimicrobiia;o Acidimicrobiales;f JdFBGBact;g ;s	0.1%	0.0%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Acidimicrobiia;o Acidimicrobiales;f koll13;g ;s	0.6%	0.0%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Acidimicrobiia;o Acidimicrobiales;f ntu14;g ;s	0.3%	0.0%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Cellulomonadaceae;Other;Other	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Corynebacteriaceae;g Corynebacterium;s	0.9%	0.1%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Microbacteriaceae;Other;Other	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Microbacteriaceae;g ;s	1.0%	0.3%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Microbacteriaceae;g Microbacterium;s	0.0%	1.7%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micrococcaceae;g ;s	0.0%	0.4%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micrococcaceae;g Renibacterium;s	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Micromonosporaceae;g ;s	12.8%	0.0%
k	Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Actinomycetales;f Mycobacteriaceae;g Mycobacterium;s	0.2%	0.1%

k	Bacteria;p	Actinobacteria;c	Actinobacteria;o	Actinomycetales:f	Nocardioidaceae:g ;s	0.4%	0.1%
k	Bacteria;p	Actinobacteria;c	Actinobacteria;o	Actinomycetales:f	Propionibacteriaceae:g	0.5%	0.1%
k	Bacteria;p	Actinobacteria;c	Thermoleophilales;o	Gaiellales:f	Gaiellaceae:g ;s	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Armatimonadetes;c	Chthonomonadetes;o	SJA-22:f ;g ;s		0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	Cytophagia;o	Cytophagales:f	Cytophagaceae:g ;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	Flavobacteriia;o	Flavobacteriales:f	Cryomorphaceae:g ;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	Flavobacteriia;o	Flavobacteriales:f	Flavobacteriaceae:g ;s	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	Flavobacteriia;o	Flavobacteriales:f	Flavobacteriaceae:g	0.0%	0.3%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	Flavobacteriia;o	Flavobacteriales:f	Flavobacteriaceae:g	0.0%	0.6%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	Flavobacteriia;o	Flavobacteriales:f	Flavobacteriaceae:g	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	Flavobacteriia;o	Flavobacteriales:f	[Weeksellaceae]:g	0.0%	0.7%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	Sphingobacteriia;o	Sphingobacteriales:f	;g ;s	0.1%	0.0%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	Sphingobacteriia;o	Sphingobacteriales:f	Sphingobacteriaceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	[Saprospirae]:o	[Saprospirales]:f	Chitinophagaceae:g ;s	1.0%	0.0%
k	Bacteria;p	Bacteroidetes;c	[Saprospirae]:o	[Saprospirales]:f	Chitinophagaceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Chloroflexi;c	Anaerolineae;o	Caldilineales:f	Caldilineaceae:g	0.0%	1.1%
k	Bacteria;p	Chloroflexi;c	Anaerolineae;o	H39:f ;g ;s		0.0%	0.4%
k	Bacteria;p	Chloroflexi;c	Anaerolineae;o	WCHB1-50:f ;g ;s		0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Chloroflexi;c	Chloroflexi;o	AKIW781:f ;g ;s		0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Chloroflexi;c	Chloroflexi;o	Chloroflexales:f	Oscillochloridaceae:g	0.0%	0.7%
k	Bacteria;p	Chloroflexi;c	Chloroflexi;o	[Roseiflexales]:f	[Roseiflexaceae]:g	0.0%	0.4%
k	Bacteria;p	Chloroflexi;c	Ellin6529;o ;f ;g ;s			0.5%	0.0%
k	Bacteria;p	Chloroflexi;c	Gitt-GS-136;o ;f ;g ;s			0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Chloroflexi;c	TK17;o	me1-48:f ;g ;s		0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Cyanobacteria;c	Chloroplast;o	Cryptophyta:f	;g ;s	0.0%	1.5%
k	Bacteria;p	Cyanobacteria;c	Chloroplast;o	Haptophyceae:f	;g ;s	0.0%	0.7%
k	Bacteria;p	Cyanobacteria;c	Chloroplast;o	Stramenopiles:f	;g ;s	0.0%	0.5%
k	Bacteria;p	Cyanobacteria;c	Chloroplast;o	Streptophyta:f	;g ;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Cyanobacteria;c	Nostocophycideae;o	Nostocales:f	;g ;s	0.0%	2.1%
k	Bacteria;p	Cyanobacteria;c	Synechococcophycideae;o	Pseudanabaenales:f	Pseudanabaenaceae:g	0.0%	0.4%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales;Other;Other;Other		0.2%	0.0%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Bacillaceae;Other;Other	0.3%	0.0%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Bacillaceae:g ;s	0.0%	0.3%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Bacillaceae:g	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Bacillaceae:g	1.5%	0.2%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Bacillaceae:g	0.0%	0.6%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Bacillaceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Paenibacillaceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Paenibacillaceae:g	0.0%	0.3%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Planococcaceae:g ;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Staphylococcaceae:g	1.7%	0.0%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	Staphylococcaceae:g	0.6%	0.0%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Bacillales:f	[Exiguobacteraceae]:g	0.0%	1.0%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Lactobacillales:f	Carnobacteriaceae:g	0.0%	0.9%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Lactobacillales:f	Enterococcaceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Bacilli;o	Lactobacillales:f	Streptococcaceae:g	0.0%	0.4%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Clostridia;o	Clostridiales:f	Clostridiaceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Firmicutes;c	Clostridia;o	Clostridiales:f	Veillonellaceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Caulobacteriales:f	Caulobacteraceae:g ;s	0.1%	2.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Caulobacteriales:f	Caulobacteraceae:g	0.0%	2.5%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhizobiales;Other;Other;Other		0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhizobiales:f	;g ;s	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhizobiales:f	Bradyrhizobiaceae:g	0.3%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhizobiales:f	Bradyrhizobiaceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhizobiales:f	Brucellaceae;Other;Other	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhizobiales:f	Hyphomicrobiaceae:g ;s	1.3%	0.4%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhizobiales:f	Methylobacteriaceae:g	0.9%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhizobiales:f	Phyllobacteriaceae;Other;Other	0.4%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhodobacterales:f	Rhodobacteraceae:g ;s	0.0%	0.3%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhodobacterales:f	Rhodobacteraceae:g ;s	0.0%	0.5%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhodobacterales:f	Rhodobacteraceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhodospirillales:f	Acetobacteraceae:g ;s	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhodospirillales:f	Rhodospirillaceae:g ;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rhodospirillales:f	Rhodospirillaceae:g	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Rickettsiales:f	Pelagibacteraceae:g ;s	0.0%	0.3%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Sphingomonadales:f	Sphingomonadaceae:g ;s	0.0%	0.3%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Sphingomonadales:f	Sphingomonadaceae:g	0.4%	7.3%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Sphingomonadales:f	Sphingomonadaceae:g	0.0%	0.6%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Sphingomonadales:f	Sphingomonadaceae:g	1.8%	0.4%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Alphaproteobacteria;o	Sphingomonadales:f	Sphingomonadaceae:g	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales:f	Alcaligenaceae:g ;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales:f	Burkholderiaceae:g	0.4%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales:f	Comamonadaceae;Other;Other	0.0%	2.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales:f	Comamonadaceae:g ;s	0.0%	3.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales:f	Comamonadaceae:g	0.0%	0.3%

k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales;f	Comamonadaceae;g	Delftia;s	0.0%	1.7%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales;f	Comamonadaceae;g	Tepidimonas;s	0.2%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales;f	Oxalobacteraceae;g	;s	60.9%	2.8%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales;f	Oxalobacteraceae;g	Janthinobacterium;s	0.1%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Burkholderiales;f	Oxalobacteraceae;g	Ralstonia;s	0.0%	0.9%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Betaproteobacteria;o	Methylophilales;f	Methylophilaceae;g	Methylostenobacter;s mobilis	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Deltaproteobacteria;o	;f ;g ;s			0.5%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Deltaproteobacteria;o	Bdellovibrionales;f	Bacteriovoraceae;g	;s	0.1%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Deltaproteobacteria;o	Desulfarcales;f	Desulfarculaceae;g	;s	0.6%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Deltaproteobacteria;o	Desulfuromonadales;f	Desulfuromonadaceae;g	;s	0.5%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Deltaproteobacteria;o	Myxococcales;f	;g ;s		0.0%	2.5%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Aeromonadales;f	Aeromonadaceae;g	;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Alteromonadales;f	Alteromonadaceae;g	HTCC2207;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Alteromonadales;f	Shewanellaceae;g	Shewanella;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Enterobacteriales;f	Enterobacteriaceae;g	;s	0.0%	1.8%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Enterobacteriales;f	Enterobacteriaceae;g	Proteus;s	4.5%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Legionellales;f	Coxiellaceae;g	;s	0.3%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Methylococcales;f	Methylococcaceae;g	;s	0.0%	0.2%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Oceanospirillales;f	Oceanospirillaceae;g	;s	0.0%	1.9%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Pasteurellales;f	Pasteurellaceae;g	Haemophilus;s parainfluenzae	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Pseudomonadales;f	Moraxellaceae;g	Acinetobacter;s	0.4%	2.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Pseudomonadales;f	Pseudomonadaceae;g	Pseudomonas;s	0.0%	39.6%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Thiotrichales;f	Piscirickettsiaceae;g	;s	1.1%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Xanthomonadales;f	Xanthomonadaceae;Other;Other		0.0%	0.5%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Xanthomonadales;f	Xanthomonadaceae;g	;s	0.0%	3.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Xanthomonadales;f	Xanthomonadaceae;g	Lysobacter;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Xanthomonadales;f	Xanthomonadaceae;g	Stenotrophomonas;Other	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	Xanthomonadales;f	Xanthomonadaceae;g	Stenotrophomonas;s	0.0%	1.1%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Gammaproteobacteria;o	[Marinicellales];f	[Marinicellaceae];g	;s	0.2%	0.0%
k	Bacteria;p	Proteobacteria;c	Zetaproteobacteria;o	Mariprofundales;f	Mariprofundaceae;g	Mariprofundus;s	0.2%	0.0%
k	Bacteria;p	Verrucomicrobia;c	Verrucomicrobiae;o	Verrucomicrobiales;f	Verrucomicrobiaceae;g	Luteolibacter;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	Verrucomicrobia;c	[Methyloacidiphilae];o	Methyloacidiphilales;f	LD19;g	;s	0.0%	0.1%
k	Bacteria;p	[Thermi];c	Deinococci;o	Deinococcales;f	Deinococcaceae;g	Deinococcus;s	0.0%	0.1%

Los microorganismos que se pudieron identificar completamente fueron las bacterias *propionibacterium acnes* presente tanta en la muestra de agua (0.5%) como en la de sedimento marino tipo lodo (0.1). Se encontraron presentes en muestras de sedimento marino tipo lodo *Polaribacter irgensii*(0.2%), *Anoxybacillus kestanbolensis* (0.2%), *Bacillus firmus* (0.6%), *Bacillus flexus*(0.1%), *Paenibacillus lautus* (0.3%), *carnobacterium viridans* (0.9%), *vagococcus salmominarum* (0.1%), *veillonella dispar* (0.1%), *Bosea genosp* (0.1%), *Sphingomonas wittichii* (0.2%), *Methylostenobacter mobilis* (0.1%), *Haemophilus parainfluenzae* (0.1%).

En la tabla 12 se observan la diversidad taxonómica de la comunidad procariota encontrada en muestras de agua y sedimento marino tipo lodo a partir del análisis del gen ARNr 16S

Tabla 12. Diversidad Taxonómica de la comunidad procariota encontrada en muestras de agua y sedimento marino tipo lodo a partir del análisis del gen ARNr 16S.

FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE
Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	EB1017		
			JdFBGBact		
			koll13		
			ntu14		
	Actinobacteria	Actinomycetales	Cellulomonadaceae		
			Corynebacteriaceae	Corynebacterium	
			Microbacteriaceae	Microbacterium	
			Micrococcaceae	Renibacterium	
			Micromonosporaceae		
			Mycobacteriaceae	Mycobacterium	
			Nocardoidaceae		
			Propionibacteriaceae	Propionibacterium	acnes
	Thermoleophilia	Gaiellales	Gaiellaceae		
Armatimonadetes	Chthonomonadetes	SJA-22			
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae		
	Flavobacteriia	Dinoflagellata			
		Flavobacteriales	Cryomorphaceae		
			Flavobacteriaceae	Flavobacterium	
				Myroides	
				Polaribacter	irgensii
			Weeksellaceae	Chryseobacterium	
Chloroflexi	Anaerolineae	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	
		Saprospirales	Chitinophagaceae	Sediminibacterium	
	Chloroflexi	Caldilineales	Caldilineaceae	Caldilinea	
		H39			
		WCHB1-50			
Cyanobacteria	Chloroplast	AKIW781			
		Chloroflexales	Oscillochloridaceae	Oscillochloris	
		Roseiflexales	Roseiflexaceae	Roseiflexus	
	Ellin6529				

		Haptophyceae				
		Stramenopiles				
		Streptophyta				
		Nostocophycideae	Nostocales			
		Synechococcophycideae	Pseudanabaenales	Pseudanabaenaceae	Leptolyngbya	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Anoxybacillus	kestanbolensis	
				Bacillus	Firmus	
					flexus	
					lautus	
			Paenibacillaceae	Paenibacillus		
			Planococcaceae			
			Staphylococcaceae	Staphylococcus		
			[Exiguobacteraceae]	Exiguobacterium		
		Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Carnobacterium	viridans	
			Enterococcaceae	Vagococcus	salmoninarum	
Clostridia	Streptococcaceae		Streptococcus			
	Clostridiaceae		Caloramator			
	Veillonellaceae	Veillonella	dispar			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Phenylobacterium		
		Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Balneimonas		
				Bosea	genosp	
			Brucellaceae			
			Hyphomicrobiaceae			
			Methylobacteriaceae	Methylobacterium		
			Phyllobacteriaceae			
		Rhodobacterales	Rhizobiaceae	Agrobacterium		
			Rhodobacteraceae	Loktanella		
				Rhodobacter		
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae			
			Rhodospirillaceae	Azospirillum		
		Rickettsiales	Pelagibacteraceae			
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium		
				Sphingobium		
				Sphingomonas	wittichii	
		Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae		
				Burkholderiaceae	Burkholderia	
	Comamonadaceae			Acidovorax		
				Delftia		
				Tepidimonas		
	Oxalobacteraceae			Janthinobacterium		
				Ralstonia		
	Deltaproteobacteria	Methylophilales	Methylophilaceae	Methylotenera	mobilis	
		Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae			
		Desulfarculales	Desulfarculaceae			

	Gammaproteobacteria	Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae		
		Myxococcales			
		Aeromonadales	Aeromonadaceae		
		Alteromonadales	Alteromonadaceae	HTCC2207	
			Shewanellaceae	Shewanella	
		Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Proteus	
		Legionellales	Coxiellaceae		
		Methylococcales	Methylococcaceae		
		Oceanospirillales	Oceanospirillaceae		
		Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus	parainfluenzae
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	
			Pseudomonadaceae	Pseudomonas	
		Thiotrichales	Piscirickettsiaceae		
		Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter	
				Stenotrophomonas	
		Marinicellales	Marinicellaceae		
	Zetaproteobacteria	Mariprofundales	Mariprofundaceae	Mariprofundus	
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	Luteolibacter	
	Methylacidiphilae]	Methylacidiphilales	LD19		
Thermi		Deinococcales	Deinococcaceae	Deinococcus	
Deinococci					

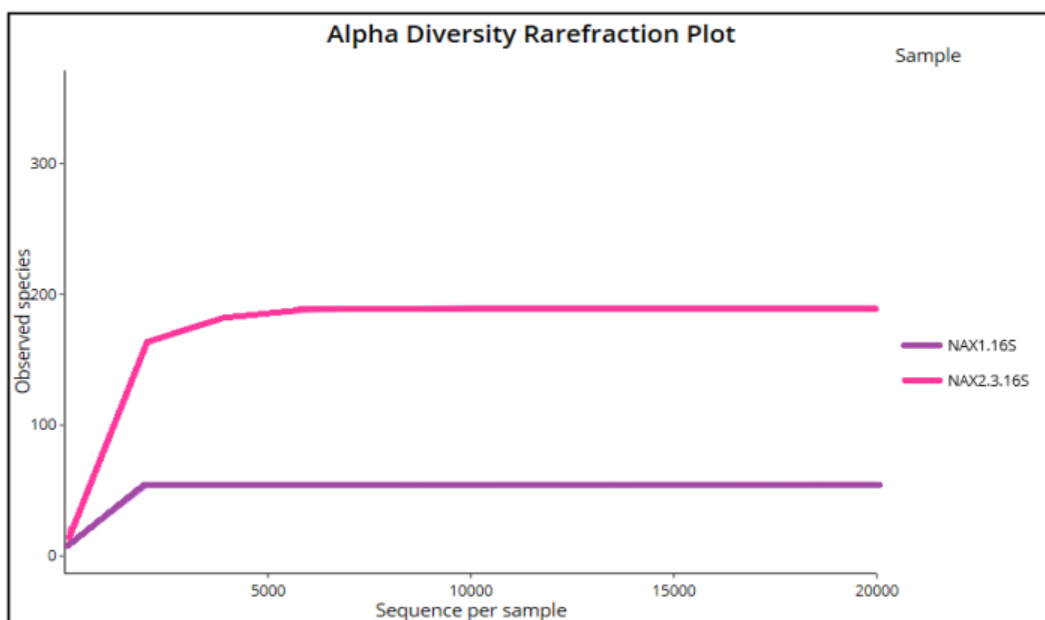
Nota* La tabla representa la diversidad de microorganismos encontrados en las muestras analizadas, en cada uno de los taxones. La diversidad encontrada en la muestra de agua (NAX 1.1) se observan en color azul, la diversidad encontrada en la muestra de sedimento marino (NAX 2.3) se observa en color rojo y la diversidad encontrada en ambas muestras se observa en color verde.

Diversidad alfa del análisis metagenómico del ARNr 16S

La diversidad alfa representa la biodiversidad intrínseca de cada comunidad, la forma más sencilla de estimar el alfa-diversidad de una comunidad concreta es mediante el número (o riqueza) de especies que la componen. La curva de rarefacción compara el número de especies en función de del tamaño de la muestra. Para el caso de los resultados aquí obtenidos la curva de rarefacción se expresa mediante la relación del número de especies por la cantidad de secuencias obtenidas.

En la figura 19, muestra la gráfica de rarefacción para Alfa diversidad, se representa en el eje “y” el número de especies observadas clasificadas en un nivel filogenético, y en el eje “x” el número de secuencias por muestra.

Figura 19. Curva de rarefacción de la diversidad alfa de la región ARNr 16S



La curva de rarefacción se crea al trazar la medición de la diversidad alfa (como las especies observadas) en diferentes tamaños de muestra. La diversidad alfa aumenta a medida que se identifican más taxones. La grafica muestra una superposición de la muestra de sedimento marino por encima de la muestra de agua.

4.2 Análisis Metagenómico del ARNr 18S

Tabla 13. Secuencias obtenidas durante el procesamiento metagenómico del ARNr 18S

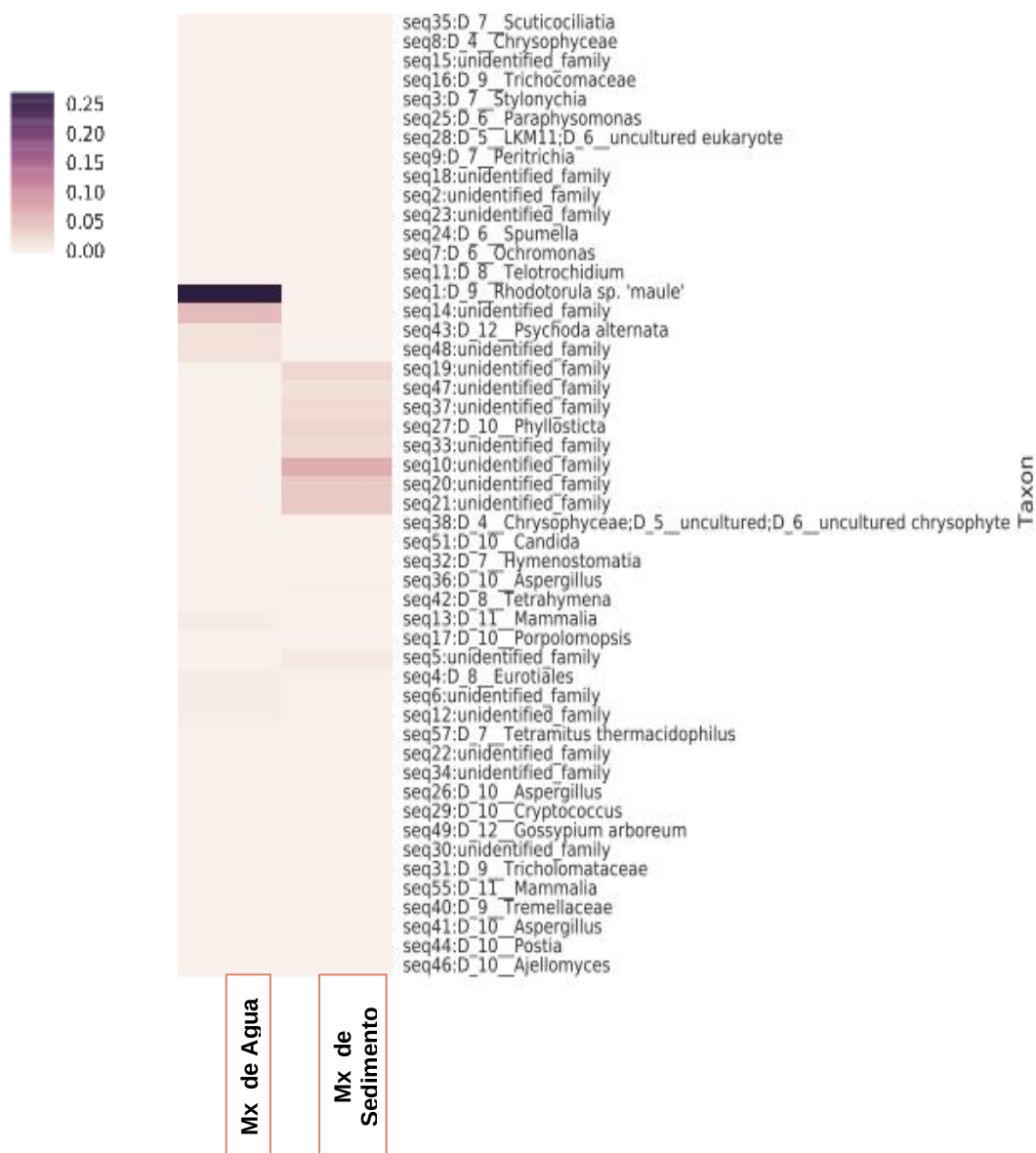
Muestra	Secuencias crudas	Secuencias recortadas	Análisis DADA2	Secuencias quiméricas	Secuencias libres de secuencias quiméricas	Secuencias únicas	Secuencias después de la filtración de tamaño	OTUs
Agua Marina	121536	120882	59836	524	59312	72	59074	47
Sedimento marino	112294	111642	55426	157	55269	147	54930	113
TOTAL	233830	232524	115262	681	114581	219	114004	160

Tabla 14. OTU identificadas y no identificadas durante el procesamiento metagenómico del ARNr 18S

Muestras	OTU	OTU identificadas						OTU no identificadas
		Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	
Agua Marina	47	4	6	8	18	19	4	28
Sedimento marino	113	8	12	17	35	40	9	73

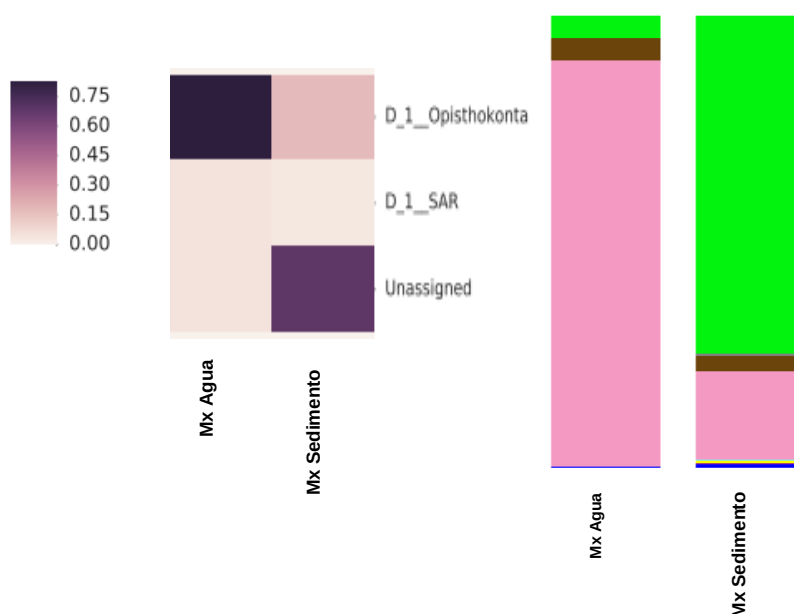
El análisis del gen ARNr 18S, como se muestra en la gráfica 20, para la muestra de agua, mayor abundancia en la secuencia 1, que corresponde a *Rhodotorula maule*, para el caso de la muestra de sedimento marino la secuencia más abundante es la secuencia 10 y relaciono con una familia no identificada.

Figura 20. Mapa de calor de abundancia de secuencias encontradas en el análisis el gen ARNr 18S.



La caracterización metagenómica dirigida al gen ARNr 18S indicó predominancia a nivel de los filos Opisthokonta (89.9% en la muestra de agua y 19.5% en la muestra de lodo) y SAR (5 % en la muestra de agua y 3.4 % en la muestra de lodo), una gran variedad de secuencias se encontraron no asignadas (5% en la muestra de agua y 74.7% en la muestra de lodo) (figura 21)

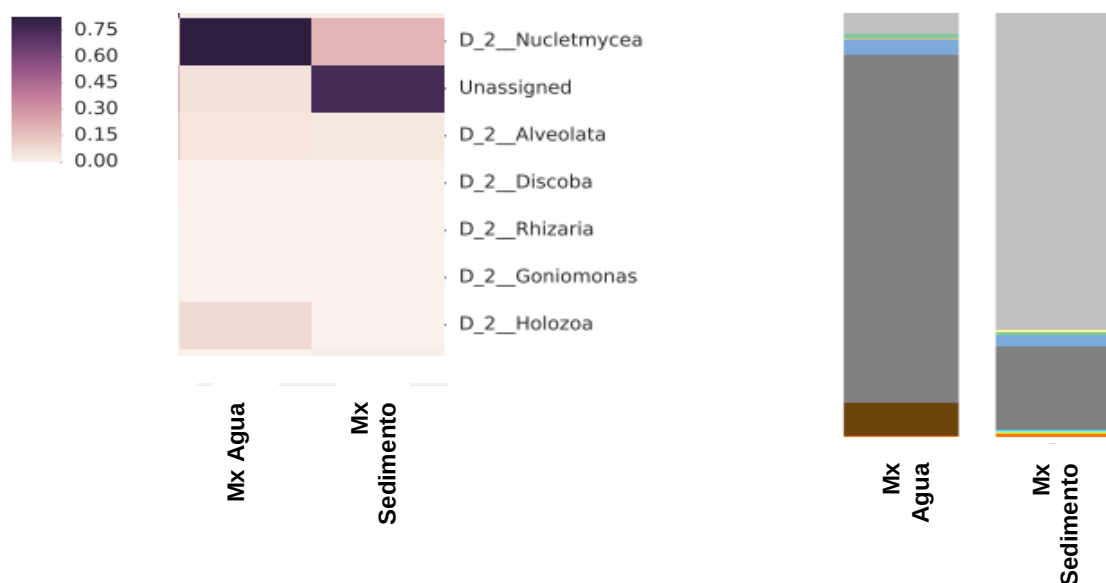
Figura 21. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición a nivel de supergrupos (derecha) en el análisis del ARNr 18S.



		Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
Legend	Taxonomy	%	%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida	0.2%	0.7%
	D_0__Eukaryota;D_1__DH147-EKD10	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Excavata	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta	0.0%	0.6%
	D_0__Eukaryota;D_1__Incertae Sedis	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta	89.8%	19.5%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR	5.0%	3.4%
	D_0__Eukaryota;Other	0.0%	0.6%
	Unassigned;Other	5.0%	74.7%

En el segundo nivel, se encontró alta abundancia de Nucletmycea (82% y 19.4%), y Alveolata (3.8% y 2.6%) en ambas muestras NAX1 (agua) y NAX2 (sedimento marino) respectivamente (figura 22).

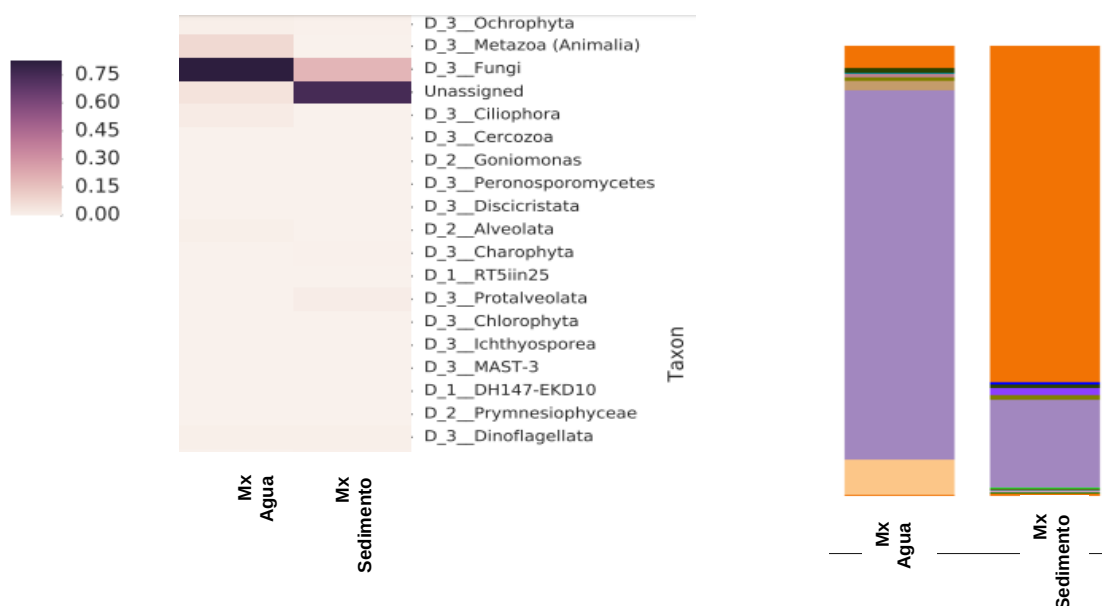
Figura 22. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición (derecha) del segundo nivel taxonómico del análisis del ARNr 18S.



		Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
Legend	Taxonomy	%	%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida	0.2%	0.7%
	D_0__Eukaryota;D_1__DH147-EKD10;D_2__uncultured eukaryote	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Excavata;D_2__Discoba	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta;D_2__Prymnesiophyceae	0.0%	0.6%
	D_0__Eukaryota;D_1__Incertae Sedis;D_2__Telonema	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa	7.8%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucletmycea	82.0%	19.4%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata	3.8%	2.6%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Rhizaria	0.3%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Stramenopiles	0.9%	0.7%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;Other	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;Other;Other	0.0%	0.6%
	Unassigned;Other;Other	5.0%	74.7%

En el tercer nivel taxonómico se encontró abundancia de Metazoa (animalia) en la muestra de agua (7.8%), en ambas muestras se predominó Fungi (82% en agua y 19.4% en lodo) (figura 23).

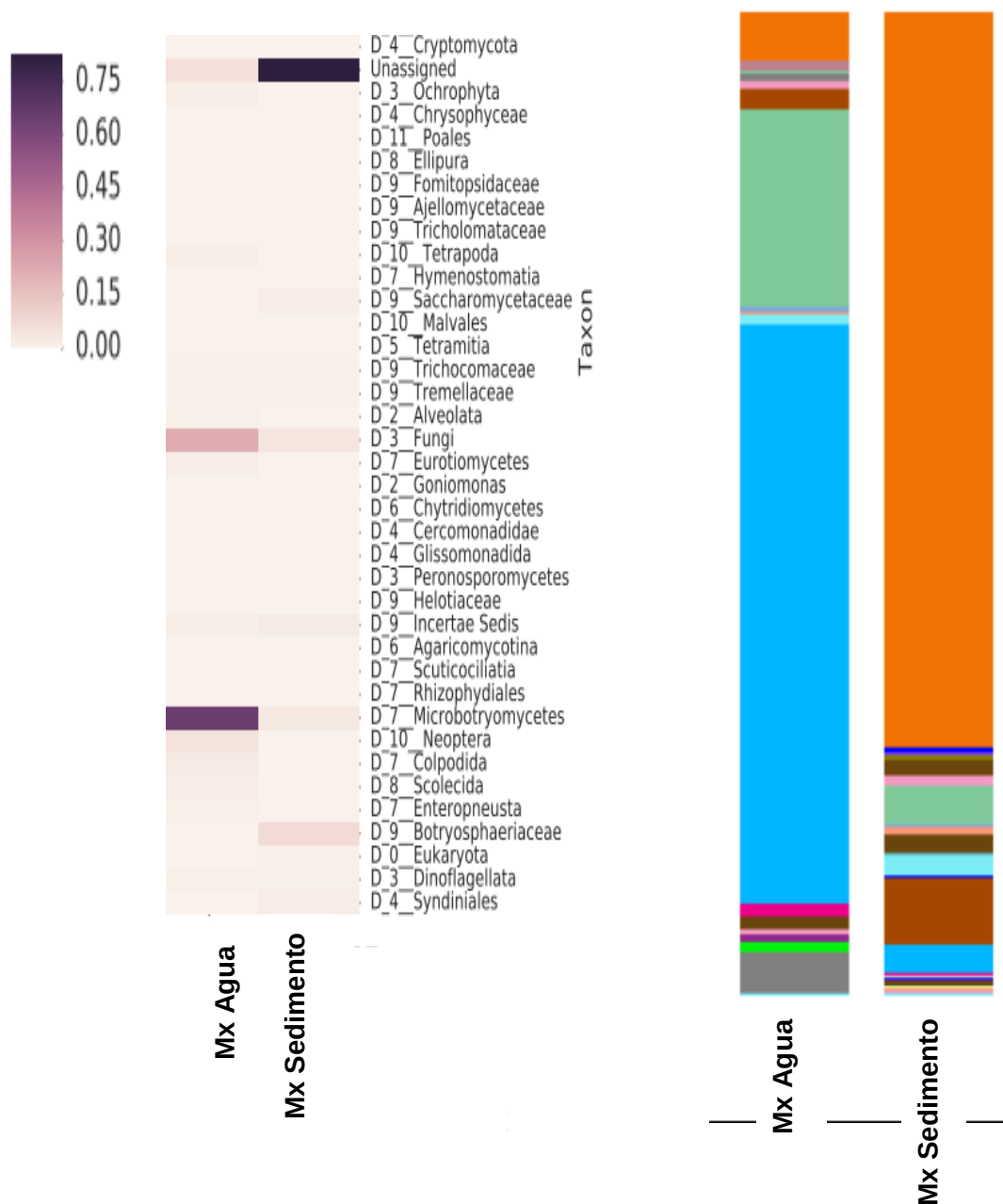
Figura 23. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición (derecha) del tercer nivel taxonómico del análisis del ARNr 18S



		Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
Legend	Taxonomy	%	%
	D_0_Eukaryota;D_1_Archaeplastida;D_2_Chloroplastida;D_3_Charophyta	0.2%	0.4%
	D_0_Eukaryota;D_1_Archaeplastida;D_2_Chloroplastida;D_3_Chlorophyta	0.0%	0.3%
	D_0_Eukaryota;D_1_DH147-EKD10;D_2_uncultured eukaryote;D_3_uncultured eukaryote	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Excavata;D_2_Discoba;D_3_Discicristata	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Haptophyta;D_2_Prymnesiophyceae;D_3_Prymnesiales	0.0%	0.4%
	D_0_Eukaryota;D_1_Haptophyta;D_2_Prymnesiophyceae;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Incertae Sedis;D_2_Telonema;D_3_uncultured eukaryote	0.0%	0.3%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia)	7.8%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nucleotmycea;D_3_Fungi	82.0%	19.4%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Ciliophora	2.2%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Dinoflagellata	0.8%	1.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Protalveolata	0.0%	1.6%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;Other	0.8%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Rhizaria;D_3_Cercozoa	0.3%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_MAST-3	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta	0.9%	0.6%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;Other;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;Other;Other;Other	0.0%	0.6%
	Unassigned;Other;Other;Other	5.0%	74.7%

En cuarto nivel taxonómico, predominaron Microbotryomycetes (58.8% en agua y 2.9% en lodo) y organismos no identificadas al grupo Fungi del segundo nivel (20% en agua y 3.7% en lodo) (figura 24).

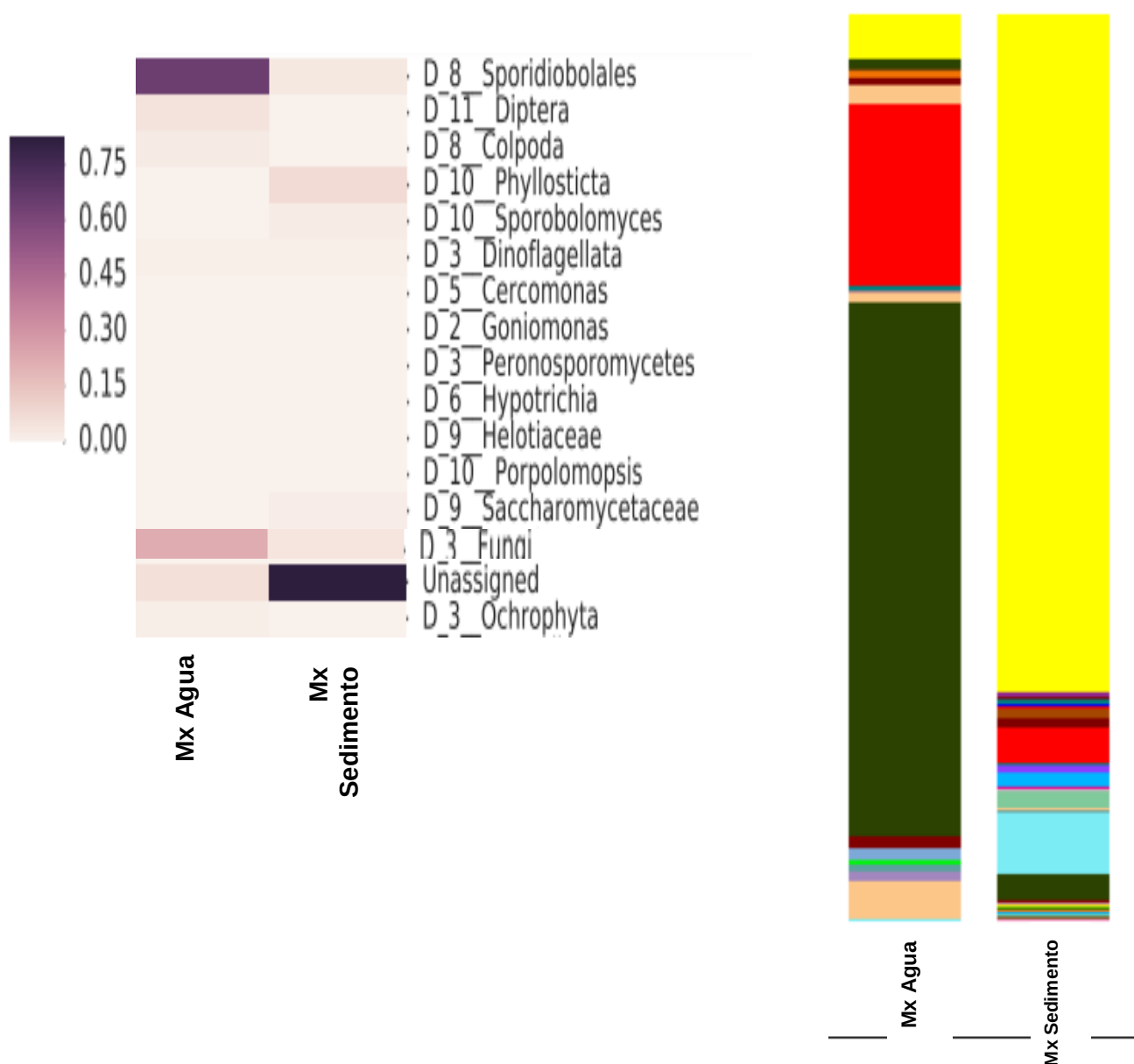
Figura 24. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición (derecha) del siguiente taxón (nivel 4, 6, 7, 8,9) que fue posible asignar del análisis del ARNr 18S



		Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
Legend	Taxonomy	%	%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Charophyta;D_10__Malvales	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Charophyta;D_11__Poales	0.2%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Charophyta;Other	0.0%	0.2%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Chlorophyta;D_5__Pyramimonadales	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__DH147-EKD10;D_2__uncultured eukaryote;D_3__uncultured eukaryote;D_4__uncultured eukaryote	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Excavata;D_2__Discoba;D_3__Discicristata;D_5__Tetramitia	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta;D_2__Prymnesiophyceae;D_3__Prymnesiales;D_4__Chrysochromulina	0.0%	0.4%
	D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta;D_2__Prymnesiophyceae;Other;Other	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Incertae Sedis;D_2__Telonema;D_3__uncultured eukaryote;D_4__uncultured eukaryote	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_10__Neoptera	4.2%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_10__Tetrapoda	1.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_7__Enteropneusta	0.7%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_8__Ascidacea	0.7%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_8__Ellipura	0.0%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_8__Scolecida	1.2%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_7__Dothideomycetes	0.1%	0.2%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_7__Eurotiomycetes	1.4%	0.2%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_7__Microbotryomycetes	58.8%	2.9%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_8__Mucoraceae	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Ajellomycetaceae	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Botryosphaeriaceae	0.0%	6.6%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Debaryomycetaceae	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Herpotrichiellaceae	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Incertae Sedis	0.9%	2.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Lyophyllaceae	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Saccharomycetaceae	0.0%	1.7%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Saccharomycodaceae	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Tremellaceae	0.4%	0.7%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Trichocomaceae	0.4%	0.4%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;Other	20.0%	3.7%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Ciliophora;D_6__Oligotrichia	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Ciliophora;D_7__Colpodida	2.2%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Dinoflagellata;D_6__Kareniaceae	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Dinoflagellata;Other	0.8%	0.9%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Protalveolata;D_4__Syndiniales	0.0%	1.6%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;Other;Other	0.8%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Rhizaria;D_3__Cercozoa;D_4__Cercomonadidae	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Rhizaria;D_3__Cercozoa;D_6__Protaspidae	0.3%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Rhizaria;D_3__Cercozoa;Other	0.0%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Stramenopiles;D_3__MAST-3;D_4__MAST-3E	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Stramenopiles;D_3__Ochrophyta;D_6__Bacillariophyceae	0.0%	0.4%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Stramenopiles;D_3__Ochrophyta;D_6__Mediophyceae	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Stramenopiles;D_3__Ochrophyta;Other	0.9%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;Other;Other;Other	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.6%
	Unassigned;Other;Other;Other;Other	5.0%	74.7%

En el siguiente nivel las secuencias con mayor abundancia no se lograron asignar (5% en agua y 74.7% en lodo), pero predominó el grupo *Sporidiobolales* (58.8% en agua y 2.9% en lodo) y organismos no identificados del grupo *Fungi* (20% en agua y 3.7% en lodo) (figura 25).

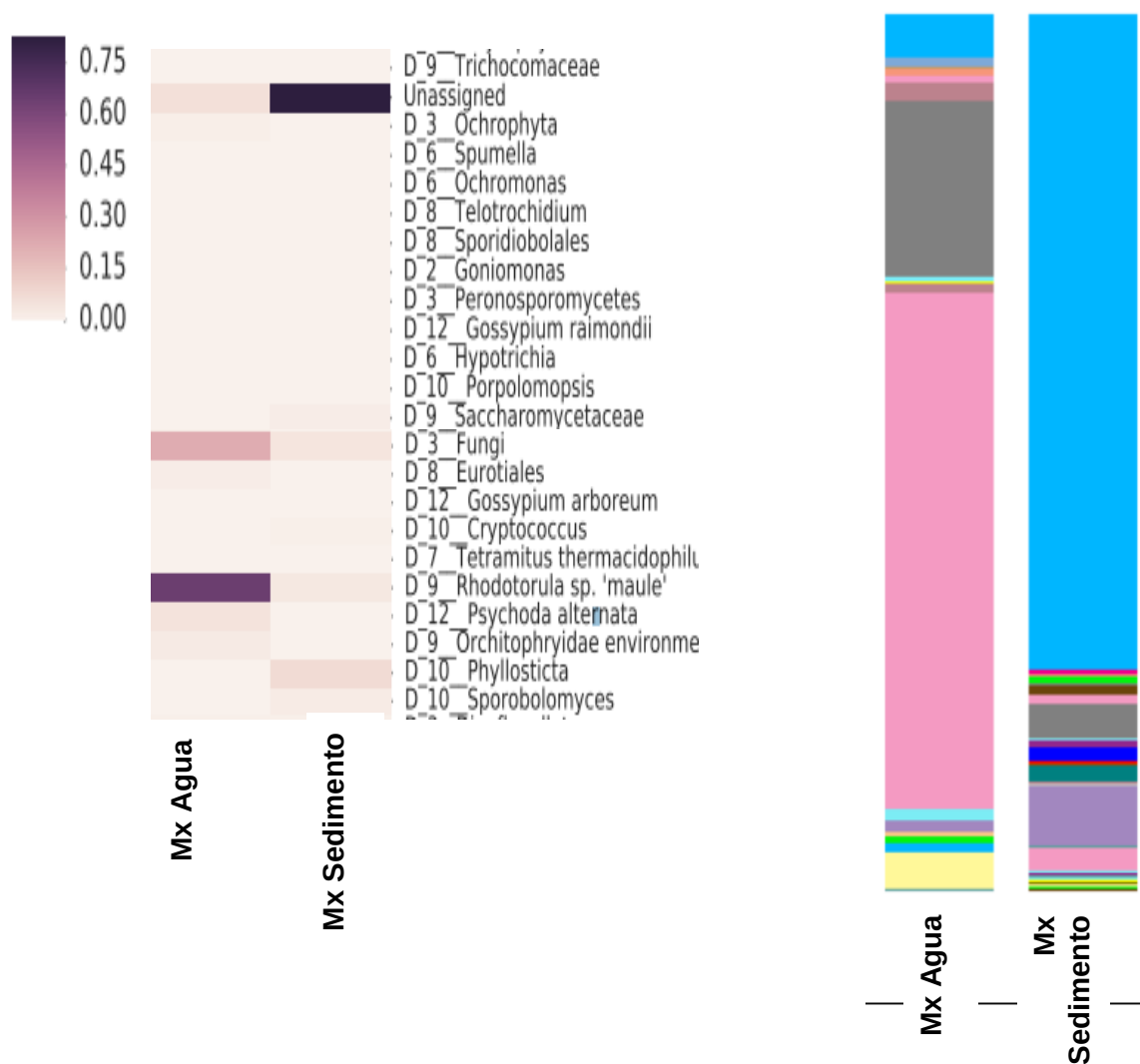
Figura 25. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición (derecha) del siguiente taxón (nivel 10) que fue posible asignar del análisis del ARNr 18S



Legend	Taxonomy	Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
		%	%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Charophyta;D_10__Malvales;D_11__Gossypium	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Charophyta;D_11__Poales;D_12__Sorghum	0.2%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Charophyta;D_11__Poales;D_12__Zea	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Charophyta;Other;Other	0.0%	0.2%
	D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida;D_2__Chloroplastida;D_3__Chlorophyta;D_5__Pyramimonadales;D_6__Pyramimonas	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__DH147-EKD10;D_2__uncultured eukaryote;D_3__uncultured eukaryote;D_4__uncultured eukaryote;D_5__uncultured eukaryote	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Excavata;D_2__Discoba;D_3__Discicristata;D_5__Tetramitida;D_6__Tetramitus	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta;D_2__Prymnesiophyceae;D_3__Prymnesiales;D_4__Chrysochromulina;D_5__uncultured marine eukaryote	0.0%	0.4%
	D_0__Eukaryota;D_1__Haptophyta;D_2__Prymnesiophyceae;Other;Other;Other	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Incertae Sedis;D_2__Telonema;D_3__uncultured eukaryote;D_4__uncultured eukaryote;D_5__uncultured eukaryote	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_10__Neoptera;D_11__Diptera	4.2%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_10__Tetrapoda;D_11__Mammalia	1.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_7__Enteropneusta;D_8__Harrimaniidae	0.7%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_8__Ascidacea;D_9__Enterogona	0.7%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Holozoa;D_3__Metazoa (Animalia);D_8__Scolecida;D_9__Capitellida	1.2%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_7__Dothideomycetes;D_8__Dothideales	0.1%	0.2%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_7__Eurotiomycetes;D_8__Eurotiales	1.4%	0.2%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_7__Microbotryomycetes;D_8__Sporidiobolales	58.8%	2.9%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_8__Mucoraceae;D_9__Rhizopus	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Ajellomycetaceae;D_10__Ajellomyces	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Botryosphaeriaceae;D_10__Phyllosticta	0.0%	6.6%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Debaryomycetaceae;Other	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Herpotrichiellaceae;Other	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Incertae Sedis;D_10__Malassezia	0.9%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Incertae Sedis;D_10__Sporobolomyces	0.0%	2.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Lyophyllaceae;D_10__Termitomyces	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Saccharomycetaceae;D_10__Pichia	0.0%	0.3%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Saccharomycetaceae;Other	0.0%	1.4%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Saccharomycodaceae;D_10__Hanseniaspora	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Tremellaceae;D_10__Cryptococcus	0.0%	0.7%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Tremellaceae;Other	0.4%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;D_9__Trichocomaceae;D_10__Aspergillus	0.4%	0.4%
	D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta;D_2__Nucleotmycea;D_3__Fungi;Other;Other	20.0%	3.7%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Ciliophora;D_6__Oligotrichia;D_7__Strombidium	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Ciliophora;D_7__Colpodida;D_8__Colpoda	2.2%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Dinoflagellata;D_6__Karniacea;Other	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Dinoflagellata;Other;Other	0.8%	0.9%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Protalveolata;D_4__Syndiniales;D_5__Syndiniales Group I	0.0%	1.2%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Protalveolata;D_4__Syndiniales;D_5__Syndiniales Group III	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;D_3__Protalveolata;D_4__Syndiniales;Other	0.0%	0.2%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Alveolata;Other;Other;Other	0.8%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Rhizaria;D_3__Cercosozoa;D_4__Cercomonadidae;D_5__Cercomonas	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Rhizaria;D_3__Cercosozoa;D_6__Protaspidiae;D_7__Cryothecomonas	0.3%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Stramenopiles;D_3__MAST-3;D_4__MAST-3E;D_5__uncultured stramenopile	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Stramenopiles;D_3__Ochrophyta;D_6__Bacillariophyceae;Other	0.0%	0.4%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Stramenopiles;D_3__Ochrophyta;D_6__Mediophyceae;D_7__Thalassiosira	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;D_2__Stramenopiles;D_3__Ochrophyta;Other;Other	0.9%	0.0%
	D_0__Eukaryota;D_1__SAR;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.1%
	D_0__Eukaryota;Other;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.6%
	Unassigned;Other;Other;Other;Other;Other	5.0%	74.7%

Las especies con alto porcentaje de abundancia no se asignaron taxonómicamente (5% en agua y 74.7% en lodo) (Figura 26) ; sin embargo se pudieron identificar completamente las especies *Rhodotorula sp. 'maule'* presente con un porcentaje de abundancia de 58.8% en agua y 2.7% en lodo, *Psychoda alternata* presente en agua con un porcentaje de abundancia de 4.2%, en lodo con un porcentaje de abundancia de 0.1% se encontró *Zea Mays*, *Gossypium arboreum* y *Tetramitus thermacidophilus*.

Figura 26. Mapa de calor de abundancia (izquierda) y diagrama de composición (derecha) del siguiente taxón (nivel 12) que fue posible asignar del análisis del ARNr 18S



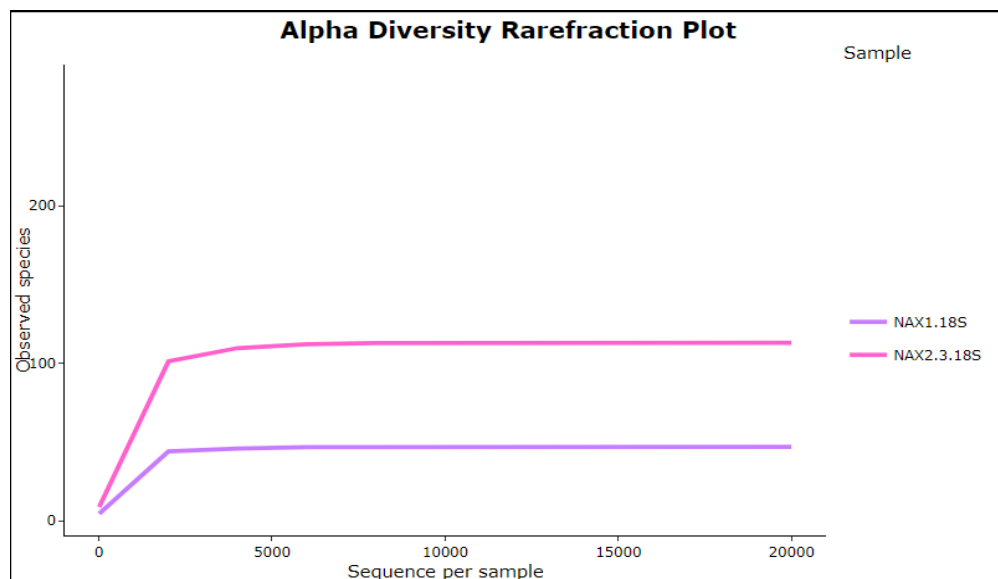
		Mx AGUA	Mx SEDIMENTO
Legend	Taxonomy	%	%
	D_0_Eukaryota;D_1_Archaeplastida;D_2_Chloroplastida;D_3_Charophyta;D_10_Malvales;D_11_Gossypium;D_12_Gossypium arboreum	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Archaeplastida;D_2_Chloroplastida;D_3_Charophyta;D_11_Poales;D_12_Sorghum;Other	0.2%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Archaeplastida;D_2_Chloroplastida;D_3_Charophyta;D_11_Poales;D_12_Zea;D_13_Zea mays	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Archaeplastida;D_2_Chloroplastida;D_3_Charophyta;Other;Other;Other	0.0%	0.2%
	D_0_Eukaryota;D_1_Archaeplastida;D_2_Chloroplastida;D_3_Chlorophyta;D_5_Pyramimonadales;D_6_Pyramimonas;Other	0.0%	0.3%
	D_0_Eukaryota;D_1_DH147-EKD10;D_2_uncultured eukaryote;D_3_uncultured eukaryote;D_4_uncultured eukaryote;D_5_uncultured eukaryote;D_6_uncultured eukaryote	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Excavata;D_2_Discoba;D_3_Discicristata;D_5_Tetramitia;D_6_Tetramitus;D_7_Tetramitus thermacidophilus	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Haptophyta;D_2_Prymnesiophyceae;D_3_Prymnesiales;D_4_Chrysochromulina;D_5_uncultured marine eukaryote;D_6_uncultured marine eukaryote	0.0%	0.4%
	D_0_Eukaryota;D_1_Haptophyta;D_2_Prymnesiophyceae;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Incertae Sedis;D_2_Telonema;D_3_uncultured eukaryote;D_4_uncultured eukaryote;D_5_uncultured eukaryote;D_6_uncultured eukaryote	0.0%	0.3%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_10_Neoptera;D_11_Diptera;D_12_Psychoda alternata	4.2%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_10_Tetrapoda;D_11_Mammalia;Other	1.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_7_Enteropneusta;D_8_Harrimaniidae;Other	0.7%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_8_Ascidiaceae;D_9_Enterogona;Other	0.7%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Holozoa;D_3_Metazoa (Animalia);D_8_Scolecida;D_9_Capitellida;Other	1.2%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_7_Dothideomycetes;D_8_Dothideales;Other	0.1%	0.2%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_7_Eurotiomycetes;D_8_Eurotiales;Other	1.4%	0.2%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_7_Microbotryomycetes;D_8_Sporidiobolales;D_9_Rhodotorula sp. 'maule'	58.8%	2.7%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_7_Microbotryomycetes;D_8_Sporidiobolales;Other	0.0%	0.2%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_8_Mucoraceae;D_9_Rhizopus;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Ajellomycetaceae;D_10_Ajellomyces;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Botryosphaeriaceae;D_10_Phylosticta;Other	0.0%	6.6%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Debaryomycetaceae;Other;Other	0.0%	0.3%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Herpotrichiaceae;Other;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Incertae Sedis;D_10_Malassezia;D_11_uncultured fungus	0.9%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Incertae Sedis;D_10_Sporobolomyces;Other	0.0%	2.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Lyophyllaceae;D_10_Termitomyces;Other	0.0%	0.3%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Saccharomycetaceae;D_10_Pichia;Other	0.0%	0.3%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Saccharomycetaceae;Other;Other	0.0%	1.4%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Saccharomycodaceae;D_10_Hanseniaspora;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Tremellaceae;D_10_Cryptococcus;Other	0.0%	0.7%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Tremellaceae;Other;Other	0.4%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;D_9_Trichocomaceae;D_10_AspERGillus;Other	0.4%	0.4%
	D_0_Eukaryota;D_1_Opisthokonta;D_2_Nuclemycea;D_3_Fungi;Other;Other;Other	20.0%	3.7%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Ciliophora;D_6_Oligotrichia;D_7_Strombidium;D_8_uncultured eukaryote	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Ciliophora;D_7_Colpoda;D_8_Colpoda;D_9_Orchitophryidae environmental sample	2.2%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Dinoflagellata;D_6_Kareniaaceae;Other;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Dinoflagellata;Other;Other;Other	0.8%	0.9%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Protalveolata;D_4_Syndiniales;D_5_Syndiniales Group I;D_6_uncultured eukaryote	0.0%	1.2%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Protalveolata;D_4_Syndiniales;D_5_Syndiniales Group III;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;D_3_Protalveolata;D_4_Syndiniales;Other;Other	0.0%	0.2%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Alveolata;Other;Other;Other;Other	0.8%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Rhizaria;D_3_Cercozoa;D_4_Cercomonadidae;D_5_Cercomonas;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Rhizaria;D_3_Cercozoa;D_6_Protaspididae;D_7_Cryothecomonas;Other	0.3%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_MAST-3;D_4_MAST-3E;D_5_uncultured stramenopile;D_6_uncultured stramenopile	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_6_Bacillariophyceae;Other;Other	0.0%	0.4%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;D_6_Mediophyceae;D_7_Thalassiosira;D_8_uncultured stramenopile	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;D_2_Stramenopiles;D_3_Ochrophyta;Other;Other;Other	0.9%	0.0%
	D_0_Eukaryota;D_1_SAR;Other;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.1%
	D_0_Eukaryota;Other;Other;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.6%
	Unassigned;Other;Other;Other;Other;Other;Other	5.0%	74.7%

Diversidad alfa del análisis metagenómico del ARNr 18S

La diversidad alfa es la biodiversidad intrínseca de cada comunidad, la forma más sencilla de estimar el alfa-diversidad de una comunidad concreta es mediante el número (o riqueza) de especies que la componen. La curva de rarefacción compara el número de especies en función de del tamaño de la muestra. Para el caso de los resultados aquí obtenidos la curva de rarefacción se expresa mediante la relación del número de especies por la cantidad de secuencias obtenidas.

En la figura 27, muestra la gráfica de rarefacción para Alfa diversidad, se representa en el eje “y” el número de especies observadas clasificadas en un nivel filogenético, y en el eje “x” el número de secuencias por muestra.

Figura 27. Curva de rarefacción de la diversidad alfa de la región ARNr 18S



La curva de rarefacción se crea al trazar la medición de la diversidad alfa (como las especies observadas) en diferentes tamaños de muestra. La diversidad alfa aumenta a medida que se identifican más taxones. La grafica muestra una superposición de la muestra de sedimento marino por encima de la muestra de agua.

5. DISCUSIÓN

La presencia de microorganismos en la Antártida es un fenómeno que no se puede refutar, los estudios científicos realizados gracias a las expediciones, en los últimos años lo demuestran^{1, 2, 8, 9,10}. En la actualidad, más de 4.000 científicos y personal de logística se trasladan a la Antártida para pasar el verano austral cada año⁴; el continente Antártico se transformó en un área de referencia y en un indicador excelente de lo que pasa en el medio ambiente global⁵⁵.

Gracias a los estudios de biología molecular y a todas las tecnologías que la involucran, los procesos de investigación de la Antártida y de múltiples ambientes del planeta, se han facilitado enormemente. Solo los resultados obtenidos en este proyecto lo indican. La secuenciación de próxima generación, es una técnica que supera la eficiencia de la caracterización microbiología convencional, obteniendo mejores resultados en el conocimiento de la comunidad tanto procariota como eucariota de una muestra.

Como se observa en la tabla 10, 11,13 y 14, para las muestras de agua y sedimento marino de la isla Livingston, se obtuvieron gracias a esta tecnología 478217 secuencias, tanto para 16S como para 18S. Después del análisis bioinformático se obtuvieron 216916 secuencias, de las cuales se clasificaron como OTU solo 405 secuencias. La enorme cantidad de secuencias obtenidas, terminan reduciéndose a un 0.1% de las secuencias originales, ya que solo estas en realidad correspondieron a alguna OTU.

La mayoría de secuencias no se pudieron asignar, ya que no encontraron similitud con la base de datos de lo reportado en el genbank. Las condiciones climáticas de la Antártida, han hecho que la descripción de especies en la zona sea demasiado baja, ya sea por la poca investigación que se ha realizado y por las características de microorganismos que pueden sobrevivir en estos ambientes. Tal es el caso que la mayoría de microorganismos que se han descrito son nuevos, por ejemplo en el año 2017 Menezes et al¹ describió a *Antarctomyces pellizariae*

sp. nov., Parka et al⁸ a *Pseudonotohymena antarctica n. g., n. sp.* y See-too et al¹⁰, a *Pseudomonas versuta sp.nov.*,

Al no encontrar las secuencias en el Genbank, es posible que estén descritas en otras bases de datos. Es pertinente a futuro para comprobar esta premisa buscar otras estrategias de búsqueda de secuencias, otras bases de datos, como la European Nucleotide Archive (ENA), y bases de datos específicamente de metagenomas como la Metagenomic Rapid Annotations (MG-RAST) o Taxonomer que permitan obtener un mejor consenso de las secuencias obtenidas.

Como se observa en la tabla 10, 11, 13 y 14 la mayoría de OTUs se encontraron en la muestra de sedimento marino por encima de la de la muestra de agua, esto se puede observar también en las figuras 19 y 27 que muestran las curvas de rarefacción, que representan la diversidad alfa de las muestras. La muestra de agua muestra 102 OTUs y la de sedimento marino 312 OTUs, lo que representa una mayor riqueza en la muestra de sedimento marino. Los sedimentos pueden contener material de diferente naturaleza y de diferentes lugares que puede explicar la mayor riqueza en este tipo de muestra. Por otro lado el volumen de las muestras de agua que se estudiaron era muy bajo de tan solo 40ml, comparando con otros estudios metagenómicos de muestras de agua de ambientes extremos como el de Puentes A, que estudio una muestra de agua de 1000ml filtradas donde las OTUs obtenidas alcanzaron las 600⁵⁶.

Dentro de los filos identificados en las muestras se encuentran Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, y Firmicutes con mayor porcentaje de abundancia y en ambas muestras. Los aislamientos bacterianos de todos los hábitats de la Antártida previamente descritos han sido relacionados con todos ellos.

Las Actinobacterias, que se encontraron en un 16.6% en la muestra de agua y un 3.6% en la muestra de sedimento marino, como se observa en la figura 13, son bacterias Gram positivas, que representan uno de los grupos más grandes del dominio Bacteria. En un estudio publicado en el año 2017⁵⁷ se aislaron más de 30 cepas bacterianas pertenecientes a este filo en diferentes ambientes de las islas

Shetland del Sur. Se destacan entre ellas los géneros *Arthrobacter*, *Streptomyces*, y *Rhodococcus* que se relacionaron con la industria farmacéutica, de alimentos, y de biocombustibles.

Los miembros de la familia Micromonosporaceae que como se observa en la figura 16, se obtuvo en un 12.8% en la muestra de agua, se conoce por tener la capacidad de sintetizar metabolitos especializados, particularmente son una fuente rica de antibióticos⁵⁸. Por otro lado, también las especies del género *Micromonospora* han sido consideradas como una fuente potencial de agentes de biocontrol, biocombustibles, y probióticos de planta⁵⁹.

Los Bacteroidetes presentes en un 1.1% en la muestra de agua, y en un 2.4% en la muestra de sedimento marino (figura 13) se encuentran muy a menudo en el suelo antártico⁶⁰. El orden Sphingobacterales, presentes en un 0.1% en ambas muestras (Figura 15) tiene la capacidad de utilizar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) como única fuente de carbono y energía⁶¹. Debido a su distribución y a sus capacidades catabólicas hacia los contaminantes orgánicos recalcitrantes, las *Sphingomonas* se pueden considerar como biocatalizadores importantes para la biorremediación del suelo⁶¹.

El Phylum Proteobacteria fue el filo con mayor proporción encontrado en las dos muestras estudiadas, como se observa en la figura 13 se obtuvo un 75.5% en la muestra de agua y un 80.3% en la muestra de sedimento marino. Este resultado coincide con reportes de aislamientos que ya se habían realizado en agua marina de la costa de las islas Shetland del sur, principalmente microorganismos de las clases Alphaproteobacteria, y Gammaproteobacteria⁶² habían sido encontrados.

Biotechnológicamente los microorganismos de este filo se asocian a procesos de biorremediación participando en la degradación de Hidrocarburos policíclicos, gracias a la presencia de la enzima alcano hidroxilasas⁶³. La familia Oxalobacteraceae presente en un 61.0% en la muestra de agua y en un 3.8% en la muestra de sedimento marino, se encuentra dentro del orden Burkholderiales y

la clase Betaproteobacteria, está formada por diversas especies como *herbaspirillum* y *collimonas*, se ha encontrado que tienen funciones metabólicas variadas, que en la actualidad se aplican como biofertilizantes o agentes de biocontrol en la agricultura, mientras que otros géneros han sido explotados para aplicaciones industriales⁶⁴.

Dentro del género *Sphigomonas* presente en un 0.2% en la muestra de sedimento marino (figura 18) se logró identificar la especie *wittichii*, este microorganismo es un degradador importante de xenobióticos, específicamente de dioxinas, de ahí su interés en procesos de biorremediación y en la comprensión de los procesos de degradación de otros xenobióticos⁶⁵.

Dentro de este filo, uno de los microorganismos que más llama la atención, es el género *Pseudomonas*, se encontró en un 39.6% en la muestra de sedimento marino, se han encontrado y descrito varias especies nuevas en la Antártida, como la *Pseudomonas antártica*⁶⁶ y la *Pseudomonas versuta*¹⁰. Teniendo en cuenta que en este estudio solo se identificó hasta género, muy probablemente la secuencia encontrada puede pertenecer a una nueva especie. Las *Pseudomonas* son ampliamente conocidas en el campo de la biorremediación, sirviendo como degradadora de hidrocarburos y sintetizadora de biosurfactantes⁶⁷.

El filo firmicutes está conformado por bacterias mayormente Gram positivas. En el estudio se identificaron principalmente los géneros *Paenibacillus* (0.3% en la muestra de sedimento), *Bacillus* (1.5% en la muestra de agua y 0.2% en la muestra de sedimento) y *Staphylococcus* (1.7% en la muestra de agua). Se han visto involucrados estos géneros en el campo de la biorremediación, se ha registrado el potencial de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, y *Paenibacillus* sp. en la reducción de cromo de aguas residuales⁶⁸. La especie *Bacillus flexus* se ha identificado como degradadora de arsénico⁶⁹. Así mismo, se ha demostrado que *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis* y *Bacillus pumilis* forman un consorcio bacteriano activo en la degradación de hidrocarburos⁷⁰.

En el año 2005 se identificó en muestras de la Antártida la especie *Paenibacillus antarcticus*⁷¹, en este proyecto se identificó hasta especie a *Bacillus firmus*, este se ha descrito como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo en cultivos de tomate⁷².

En el análisis del ARNr 16S no se obtuvieron dentro de la diversidad identificada Archeas, resulta paradójico que en el análisis de las muestras de agua y sedimentos marino de la isla Livingston, sabiendo que la mayor parte de organismos extremófilos pertenecen al dominio Arquea⁶⁰, se esperaba encontrar arqueas psicrófilas en las muestras de la Antártida. Los primers que se utilizaron amplifican la región variable V3 y V4 del gen ARNr 16S, el estudio de Takahashi et al⁷³, demostró una amplia cobertura de estos en la asignación taxonómica principalmente de filos bacterianos y arqueas usando secuenciación de próxima generación. Teniendo referencia de la especificidad de los primer usos, probablemente este resultado pueda deberse también la limitado uso que se hizo de las bases de datos existentes, como ya se explicó anteriormente, o también podría atribuirse a un sesgo en el protocolo de extracción de ADN, Covacevich F, et al recomienda para el estudio metagenómico de archeas el método de extracción de fenol cloroformo⁷⁴.

Para el caso del gen ARNr 18S, también se encuentra en debate la eficiencia de las regiones que se amplificaron en el estudio, estas fueron la regiones V4 y V5, Hadziavdic et al⁵⁵ demostro que primers que amplifican esta región son adecuados para el análisis de la biodiversidad eucariótica, también Hugerth et al, demostró que la región V4 y V6, da una distribución más amplia de los taxones Eucariotas. Los estudios en el ARNr 18S, son más limitados⁷⁵.

En los hallazgos obtenidos en los eucariotas, la diversidad es mucho más amplia. Se comprueba lo afirmado por Burki F⁷⁶, quien hizo una relación de eucariotas con diversidad y describe que utilizar el término diversidad para los eucariotas es bastante redundante. Los eucariotas abarcan aproximadamente una biodiversidad total que puede llegar a suponer una cifra de 10.000.000 de especies⁷⁷. La organización taxonómica de los eucariotas ha sido una tarea difícil⁷⁶, siempre

habido controversia y diversas teorías la han estado envolviendo. Con los avances de la genómica muchos conceptos taxonómicos se han fortalecido y han establecido cambios en varias organizaciones que ya se conocían. En los trabajos de Ruggiero et al.⁷⁸ y de Burki F⁷⁶, se observan diversos puntos de vista con respecto a esto. Ruggiero et al⁷⁸ establecen una clasificación que divide a los eucariotas en diversos reinos: Protozoa, Chromista, Fungi, Plantae y Animalia. Burki F clasifica taxonómicamente los eucariotas dividiéndolos en supergrupos⁷⁶.

Los supergrupos identificados en las muestras de agua y de sedimento marino de la isla Livingston fueron Archaeplastida con un 0.2% y 0.7% respectivamente (Figura 21), Ospistokonta con un 89.8% y un 19.5%, y SAR con un 5% y 3.4%. Excavata, Haptophyta, Incerteae Sedis predominaron en la muestra de sedimento marino.

El supergrupo Archaeplastida, lo componen las plantas superiores, inferiores y las algas, equivale a lo que se conoce como el reino Plantae en otros sistemas de clasificación. Por el origen de las muestras, no se esperaba encontrar muchas plantas, la vegetación de la Antártida queda restringida a los mínimos espacios libres de hielo que aproximadamente son menos del 1% del territorio⁷⁹. Hasta el momento se han descrito alrededor de 400 especies de hongos liquenizados⁷⁹ y más de 100 especies de musgos⁸⁰, abundantes colonias de algas y dos únicas plantas vasculares nativas de la Antártida *Deschampsia antarctica* y *Colobanthus quitensis*⁸¹ que principalmente crecen en la isla Livingston.

De todas estas especies esperadas, se encontró solo en la muestra de suelo el alga del género *Pyramimonas*, ya se había encontrada antes en la Antártida⁸². Los resultados, contrario a lo esperado, mostraron presencia de las especies *Gossypium arboreum* (algodón) y *Zea mays* (maíz), también en la muestras de sedimento marino, este fue un hallazgo completamente inesperado, nunca habían sido encontrados en la Antártida, existen incluso documentos que denotan que su distribución es cosmopolita, localizándose en la mayor parte de las regiones del mundo salvo la Antártida o el Ártico⁸³.

Teniendo en cuenta que la muestra de suelo es sedimento marino, y que los porcentajes de abundancia son muy bajos, la presencia de estas plantas se podría explicar, y considerando que el origen del sedimento no solo es del mar donde se observa⁸⁴, es posible que a través de corrientes aéreas lleguen los componentes de este material desde miles de kilómetros⁸⁵, material que puede ser de naturaleza inorgánica (p. ej., minerales) u orgánica (restos y/o desechos de organismos)⁸⁵. Se podría suponer que así pudieron llegar los restos, semillas o polen de estas plantas que permitieron encontrar su ADN en la muestra estudiada.

Otro resultado inusual fue la presencia de la especie *Psychoda alternata*, es del supergrupo Opisthokonta, que lo conforman formas unicelulares flageladas, hongos verdaderos (Fungi) y animales verdaderos (Animalia). *Psychoda alternata* es un díptero conocido comúnmente como mosca del drenaje por su afinidad por los lugares húmedos, tiene una longitud de 2 mm, lo que permite su fácil transporte con el viento. En los últimos años se han generado reportes acerca de la presencia de insectos como las llamadas moscas domésticas en la Antártida que viajan sobre la indumentaria de turistas y científicos que visitan el continente. El calentamiento global, está causando alzas en las temperaturas que se dice empiezan a crear una ambiente ideal para estos insectos⁸⁶.

Como el objetivo de este estudio era la búsqueda de organismos procedentes de la Antártida, lo obtenido y las posibles explicaciones a su hallazgo nos generan muchas dudas, como ya se explicó anteriormente. Las herramientas para el estudio del ADN, como la metagenómica permiten conocer los organismos que componen la muestra estudiada, sin importar si es materia viva o muerta. Hay un uso creciente de la metatranscriptómica para dirigirse a los miembros activos de las comunidades microbianas⁸⁷, quizá el estudio del ARN podría haber brindado en el estudio más especificidad para poder establecer las comunidades propias de la Antártida. El uso del ARN como objetivo molecular para microbios vivos tiene sentido desde el punto de vista biológico, ya que la transcripción se encuentra entre los primeros niveles de respuesta celular a los estímulos⁸⁷.

Del supergrupo Opisthokonta se encontraron principalmente hongos y levaduras que están asociados a aspectos biotecnológicos. El género de levaduras *Rhodotorula* del cual se identificó la especie '*maule*', se presentó como excelente candidata para la producción de una materia prima alternativa a los aceites vegetales en la producción de biodiesel⁸⁸.

Las especies de *Aspergillus* se han encontrado asociadas a procesos de biorremediación, principalmente en la biodegradación de petróleo⁸⁹, organofosforados⁹⁰ y níquel⁹¹. De la misma manera se ha encontrado a especies de *Rhizopus* sp. involucradas en la degradación de metales pesados⁹².

El supergrupo SAR, se denominó así como un acrónimo de sus constituyentes: Stramenopiles, Alveolates y Rhizaria⁷⁶. Comprende organismos muy diversos, desde algas unicelulares y pluricelulares hasta depredadores y parásitos, incluyendo ciliados, flagelados y ameboides^{76, 93}. Las pocas especies que se identificaron correspondieron a Eucariotas sin cultivar (*uncultured eukaryote*), estas son secuencias de genomas que se empezaron a identificar y reconocer gracias al auge de la metagenómica. Su principal función parece ser la fijación de CO₂ en los océanos⁹⁴.

Muchos de los resultados que se catalogaron como resultados no esperados, pero teniendo en cuenta la lista de microorganismos antes encontrados en la Antártida, la mayoría de los resultados obtenidos, concuerdan con lo ya mencionado. Procesos como el calentamiento global, están haciendo que las condiciones climáticas de la Antártida se modifiquen permitiendo la adaptabilidad de nuevas especies y la supresión de otras tantas. Todas estas variaciones evidencian una evolución que demuestran la dinámica de un lugar que se creía estático.

6. CONCLUSIONES

En análisis se obtuvieron 244390 secuencias crudas, de las cuales se clasificaron como OTU (Unidades Taxonómicas Operacionales) solo 405 secuencias. El 41% de estas se calificaron taxonómicamente tanto para procariotas como eucariotas, y el 59% restante correspondieron a secuencias no identificadas.

El análisis del gen ARNr 16S permitió identificar en las muestras estudiadas principalmente los phylum Proteobacteria, Actinobacteria, y Firmicutes, las familias Oxalobacteraceae y Pseudomonadaceae, así también dentro de estos los géneros *Pseudomonas* y *Novosphingobium* y las especies *Polaribacter irgensii*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus flexus*, *Paenibacillus lautus*, *Carnobacterium viridans*, *Vagococcus salmoninarum*, *Veillonella dispar*, *Bosea genosp.*, *Sphingomonas wittichii*, *Methylobacterium mobilis*, y *Haemophilus parainfluenzae*.

En el análisis del gen ARNr 18 se pudieron identificar, principalmente los supergrupos SAR, Opisthokonta, y Archaeplastida; y dentro de estos las especies *Rhodotorula sp. 'maule'*, *Psychoda alternata*, *Zea Mays*, *Gossypium arboreum* y *Tetramitus thermacidophilus*.

De los microorganismos identificados en el estudio metagenómico de la diversidad procariota, hay microorganismos que se relacionan en su mayoría con procesos de biorremediación y biotecnología. Para el caso de los eucariotas los organismos que más se asocian con aspectos biotecnológicos son los hongos.

Los integrantes del filo proteobacteria se han encontrado asociados en la degradación de hidrocarburos y xenobióticos. De la diversidad encontrada resaltan de este grupo, la familia Oxalobacteriaceae y los géneros *Pseudomonas* y *Sphingomonas*. En el filo Actinobacteria, se encontraron las familias Micromonosporaceae y Streptomyetaceae que se han relacionado con la industria farmacéutica, de alimentos y de biocombustibles. En el filo Firmicutes, las especies del género *Bacillus*, se conocen como degradadoras de hidrocarburos

mediante la formación de consorcios bacterianos. Los hongos de los géneros *Aspegillus* y *Rhizopus* encontrados, se han asociado también a procesos de biorremediación. Las levaduras del género *Rhodotorula* se han relacionado con la producción de biodiesel.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹de Menezes G, Godinho V, Porto B, Gonçalves V, Rosa L. *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. *Extremophiles* [Internet]. 2017 [25 Mar 2017]; 21(2):259-269. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27900476>
- ²Choudhari S, Ruchi L, Grigorie A. Comparative metagenome analysis of an Alaskan glacier. Imperial College Press [Internet]. 2014 [25 Mar 2017]; Vol. 12, No. 2 1441003. Disponible en: <https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0219720014410030?journalCode=jbcb>
- ³Arctic and antarctic collection [Internet], Estados Unidos y Canadá, 2008 [16 Oct 2017]. Disponible en: <http://www.arcticantarcticcollection.com/polardifferences.html>
- ⁴Secretaría del tratado Antártico [Internet], Buenos Aires; 2013 [16 Oct 2017]. Disponible en: <http://www.ats.ag/s/ats.htm>
- ⁵Tratado Antártico. Washington D.C. Octubre 15 1959. Disponible en: http://www.inae.gob.ec/wpcontent/uploads/2017/06/tratado_antartico.pdf
- ⁶Zablocki O, van Zyl L, Adriaenssens EM, Rubagotti E, Tuffin M, Cary SC, et al. Niche-dependent genetic diversity in Antarctic metaviromes. *Bacteriophage* [Internet], 2014 [18 Nov 2017];4(4):e980125. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4589984/>
- ⁷Held BW, Blanchette RA. Deception Island, Antarctica, harbors a diverse assemblage of wood decay fungi. *Fungal Biology* [Internet], 2017 [18 Nov

2017], 121(2):145-157, Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614616301763>

- ⁸Parka K, Jung J, Min G, Kim S. *Pseudonotohymentha antarctica* n. g., n. sp. (Ciliophora, Hypotricha), a New Species from Antarctic Soil. *J Eukaryot Microbiol* [Internet]. 2017 [25 nov 2017] 64(4):447-456. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869341>
- ⁹Wei Song, Lingzhi Li, Hongliang Huang, Keji Jiang, Fengying Zhang, Xuezhong Chen, et al. The Gut Microbial Community of Antarctic Fish Detected by 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *BioMed Research International* [Internet]. 2016 [30 nov 2017] Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/3241529/>
- ¹⁰See-Too W, Salazar S, Ee R, Convey P, Chan K, Peix A. *Pseudomonas versuta* sp. nov. Isolated from Antarctic soil. *Systematic and Applied Microbiology* [Internet]. 2017 [30 Ene 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2017.03.002>.
- ¹¹Manucharova N, Trosheva E, Kol'tsova E, Demkina E, Karaevskaya E, Rivkina E, et al. Characterization of the structure of the prokaryotic complex of Antarctic permafrost by molecular genetic techniques. *Microbiology* [Internet]. 2016 [10 Ene 2018]. 85(1):102-108. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261716010057>
- ¹²Lulu Li, Meiling An, Changfeng Qu, Zhou Zheng, Yibin Wang, Fangming Liu, et al. Molecular cloning and expression analysis of major intrinsic protein gene in *Chlamydomonas* sp. ICE-L from Antarctica. *Extremophiles* [Internet]. 2017 [31 may 2018]. 21(4):817. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28597046>
- ¹³La Ferla R, Azzaro M, Michaud L, Caruso G, Lo Giudice A, Paranhos R, et al. Prokaryotic Abundance and Activity in Permafrost of the Northern Victoria Land and Upper Victoria Valley (Antarctica). *Microb Ecol* [Internet]. 2017 [15

may 2018]. 74(2). Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289836>

¹⁴Cary S, McDonald I, Barret JE. On the rocks: the microbiology of dry valley soils of Antarctica. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2010 [25 Jun 2018]. . 8: 129 – 138. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2281>

¹⁵Steven B, Briggs G, McKay CP, et al. Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. FEMS Microbiol. Ecol [Internet].2007 [5 Abr 2018]. 59(2):513-23.Disponible en: <https://academic.oup.com/femsec/article/59/2/513/554230>

¹⁶Jansson J, Tarp N. The microbial ecology of permafrost. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2014 [5 Abr 2018]12: 414 – 425. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3262>

¹⁷Pace, N., Stahl, D., Lane, D., and Olsen, G. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. ASM News [Internet]. 1985 [8 Abr 2018]. 51: 4–12. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-0611-6_1

¹⁸Schmidt, T, Delong, E., And Pace, N. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. Journal of Bacteriology [Internet].1991 [14 Abr 2018]. 173: 4371-4378. Disponible en: <https://jb.asm.org/content/173/14/4371.long>

¹⁹Venter, J., Remington, K., Heidelberg, J., And Halpern, A. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science [Internet]. . 2004 [15 Abr 2018].304: 66–74. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=15001713>

- ²⁰Montaña JS, Aproximación Metagenómica Para la Identificación de enzimas lipolíticas en suelo de bosque Alto Andino del Parque Nacional Natural Los Nevados. [dissertation]. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana; 2015.127p. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/1700>
- ²¹Ford A. Antártida. Encyclopædia Britannica, inc. [Internet], 2018. [Citado 16 julio 2018] Disponible en: <https://www.britannica.com/place/Artida>
- ²²Cavicchioli R. Microbial ecology of Antarctic aquatic systems. Nature Reviews. Microbiology [Internet]. 2015 [22 May 2018]. 1,;13(11):691-706. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3549>
- ²³Farman J, Gardiner B, Shanklin J. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO x /NO x interaction. Nature [Internet].. 1985[25 abr 2018]; 315 (6016):207-210. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/315207a0>
- ²⁴Marshall K. Advances in Microbial Ecology. Plenum Press [Internet]; 1990 [22 abr 2018]. ISSN: 0147-4863. Disponible en: <https://www.springer.com/series/5612>
- ²⁵Age of Exploration - [Internet] Curriculum Guide - The Mariners' Museum - Newport News, Virginia [Internet]. Web.archive.org. 2018. Disponible en: <https://web.archive.org/web/20060207175624/http://www.mariner.org/educationalad/ageofex/cook.php>
- ²⁶Fabian Gottlieb von Bellingshausen - Antarctic Logistics & Expeditions [Internet]. Antarctic Logistics & Expeditions. 2018. Disponible en: <https://antarctic-logistics.com/2010/08/28/fabian-gottlieb-von-bellingshausen/>
- ²⁷Livingston Island. Diccionario geográfico del territorio antártico británico. Comité de nombres de lugares antárticos del Reino Unido (fragmento narrativo: *Ostrov Smolensk, así llamado por la RAE después de la Batalla de Smolensk en 1812*)

- ²⁸Merino H. Expedición Científica en las Shetland del Sur. Revista enfoque. 2015. [Citado 16 julio 2018] disponible en: <https://www.revistaenfoque.cl/expedicion-cientifica-en-las-shetland-del-sur>
- ²⁹Malvé M, Gordillo S, Rivadeneira M. Estructura de las comunidades bentónicas en tres sitios de las islas Shetland del Sur (Antártida): patrones de diversidad, composición y tamaños corporales. Anales Instituto Patagonia (Chile) [Internet], 2014 [21 May 2018]. 42(1):53-62. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ainpat/v42n1/art04.pdf>
- ³⁰Ley 67/1988 de 22 de diciembre. Por medio de la cual se aprueba el Tratado Antártico, suscrito en Washington el 1o. de diciembre de 1959. DIARIO OFICIAL. AÑO CXXV. N. 38624.
- ³¹Cancillería de la República de Colombia [Internet]. Antarctic Affairs. Ministerio de Relaciones Exteriores: Bogotá D.C., Colombia. Disponible en: <https://www.cancilleria.gov.co/en/antarctic-affairs>
- ³²Comisión Colombiana del Océano [Internet]. Cco.gov.co. 2018. Disponible en: <http://www.cco.gov.co/programa-antartico-colombiano.html>
- ³³Torres P. Informe de la III Expedición Científica de Colombia a la Antártida “Almirante Padilla”, Verano Austral 2016-2017. ARC - ENAP – Dimar. Disponible en: <http://www.cco.gov.co/83-publicaciones/489-informe-de-la-iii-expedicion-de-colombia-a-la-antartida-almirante-padilla.html>
- ³⁴Dalmaso G, Ferreira D, Vermelho A. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. Mar Drugs. 13(4):1925-65.2015 - PubMed - NCBI Ncbi.nlm.nih.gov. 2018[Internet] [citado 22 enero 2018] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413194/>
- ³⁵Tsuji M, Yokota Y, Shimohara K, Kudoh S, Hoshino T. An application of wastewater treatment in a cold environment and stable lipase production of

Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. PLoS One.;8(3). [Internet] 2013 [citado 22 Enero 2018] Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059376>

- ³⁶Hernández De Lira O, Huber D, Luévanos M et al. Metagenómica: concepto y aplicaciones en el mundo microbiano. 2014. Fronteras en Microbiología Aplicada. Autonomous University of Coahuila. pp 185-207.
- ³⁷ Genti S. Metagenómica más allá del genoma de los microorganismos, historia y utilidades. [Internet]. [Citado abril, 2017] .Disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/Bitacora/article/view/5573/603>
- ³⁸Davenport C, Tümmler B. Advances in computational analysis of metagenome sequences. Environmental Microbiology [Internet]. 2013 [21may 2018]. 15(1), 15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882611>
- ³⁹Vieites, J. M, Guazzaroni, M.E, Belouqui, A, Golyshin, P. N, Ferrer, M. Metagenomics approaches in systems microbiology. Microbiology Reviews [Internet]. 2009 [15 May 2018]. 33(1), 236–255. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054115>
- ⁴⁰Woese, C. R. Bacterial evolution. Microbiological Reviews [Internet].1987 [14 jun 2018]; 51(2), 221– 271. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373105/>
- ⁴¹Handelsman J, Rondon, M., Brady S. F, Clardy, J. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & Biology [Internet]. 1998[24 Jun 2018] 5(10), R245–249. Disponible en: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074-5521\(98\)90108-9](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074-5521(98)90108-9)

- ⁴¹Hewlett Packard Enterprise. [Internet]. ¿Qué es la secuenciación de nueva generación? [Citado 14 Junio 2018]. Disponible en: <https://www.hpe.com/es/es/what-is/next>.
- ⁴²BioSystems S.A. Secuenciación de Nueva Generación: Fundamentos y Aplicaciones de una Tecnología Revolucionaria [Video File]. [Consultado el 13 de Junio de 2018] [1: 01:51]. Disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=Y_Cr2_I2iN8
- ⁴³Garibyan, L., & Avashia, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). The Journal of Investigative Dermatology [Internet]. 2013 [14 May 2018] 133. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- ⁴⁴Valenzuela F, Casillas R, Villalpando E, Vargas F, Harris C. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. Ciencias marinas [Internet], 2015 [20 jun 2018], 41(4), 297-313 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X0473073>
- ⁴⁵Mitreva M. The Microbiome in Infectious Diseases. Infectious Diseases: Elsevier [Internet], 2017 [20 jun 2018]; p. 74.e2. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858000083>
- ⁴⁶Rodicio MdR, Mendoza MdC. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. [Internet], 2004 [20 jun 2018];22(4):238. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X04730736>
- ⁴⁷Nguyen N-P, Warnow T, Pop M, White B. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. Npj Biofilms Microbiomes [Internet], 2016 [26 jun 2018] 2:16004. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/npjbiofilms20164>

- ⁴⁸Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Caporaso JG, y Knight, R. Usando QIIME para analizar secuencias del gen 16S rRNA de comunidades microbianas Protocolos actuales en Bioinformática / Junta Editorial [Internet], 2016 [26 jun 2018]. Disponible en: <http://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>
- ⁴⁹McGinnis S, Madden T. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Research [Internet]. 2004 [26 jun 2018]. Disponible en: <http://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
- ⁵⁰Duarte, O. La bioprospección en Colombia. EXPEDITO. [Internet]. 2011. [25 mar 2018] (7). Disponible en: <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/EXP/article/view/732>
- ⁵¹Alatorre G. Bioprospección, ¿una herramienta para el manejo sostenible de los recursos naturales?. [Internet]. [28 abr 2018] Disponible en: <http://base.d-ph.info/es/fiches/premierdph/fiche-premierdph-1858.html>
- ⁵²Hlihor, R. M., Gavrilescu, M., Tavares, T., Favier, L., & Olivieri, G. Bioremediation: An Overview on Current Practices, Advances, and New Perspectives in Environmental Pollution Treatment. [Internet]. 2017. [30 jun 2018]. BioMed Research International. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/6327610/>
- ⁵³White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. [Internet]. 1990. [28 mar 2018]. PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual Publisher: Academic Press. Disponible en: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- ⁵⁴Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR

- primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. [Internet]. 2013. [01 abr 2018]. Nucleic Acids Research, 41(1), e1. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article/41/1/e1/1164457>
- ⁵⁵ Hadziavdic K, Lekang K, Lanzen A, Jonassen I, Thompson EM, Troedsson C. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. 2014. PLoS ONE 9(2): e87624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>
- ⁵⁶ Puentes A. Caracterización metagenómica de las termas de Choconta, Cundinamarca. 2017. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- ⁵⁷ Barrientos L, Lamilla C, Santos A. Actinobacterias fuente inagotable de recursos biotecnológicos. Boletín Antártico Chileno. [Internet]. 2017. [23 may 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/325176785_Actinobacterias_fuente_inagotable_de_recursos_biotecnologicos
- ⁵⁸ Salazar A, Ordoñez C, Hernández D, Castaño M, Pérez K, Rodríguez J, Bueno L. Actinomicetos aislados del suelo del Jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. [Internet]. 2014. [30 may 2018]. Scientia et Technica Año XIX, Vol. 19, No. 2, Junio de 2014. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701 223. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/8397>
- ⁵⁹ Schultz J, de Souza Y, Mansur M, Vermelho A, da Mota F, Rosado A. Draft Genome Sequence de Microbacterium sp. Cepa LEMMJ01, aislada del suelo ornitogénico antártico. [Internet]. 2017. [5 jun 2018]. Anuncios del genoma. 5 (29): e00672-17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408115/>
- ⁶⁰ Aislabie J, Chhour K, Saul D, Miyauchi S, Ayton J, Paetzold R et al. Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. [Internet]. 2006. [5 jun 2018]. Soil Biology and Biochemistry. 38(10):3041-

3056. Disponible en:

https://www.landcareresearch.co.nz/publications/researchpubs/Aislabie_etal_dominant_bacteria_SBB_2006.pdf

⁶¹Leys N, Ryngaert A, Bastiaens L, Verstraete W, Top E, Springael D. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. [Internet]. 2004. [10 jun 2018].

Applied and Environmental Microbiology. 70 (4): 1944-1955. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066784>

⁶²Landone Vescovo IA, Golemba MD, Di Lello FA, Culasso ACA, Levin G, Ruberto L, et al. Rich bacterial assemblages from Maritime Antarctica (Potter Cove, South Shetlands) reveal several kinds of endemic and undescribed phylotypes. [Internet]. 2014. [10 jun 2018]. Revista Argentina de Microbiologia. 46(3):218-230. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-rich-bacterial-assemblages-from-maritime-S0325754114700768>

⁶³Izquierdo A. Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. [Internet]. 2013. [15 jun 2018]. dissertation. Universidad de Barcelona. 265p. Disponible en: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/53361/1/ARIR_TESIS.pdf

⁶⁴Baldani, I.Rouws, L.Cruz, L.Schmid, M.Hartmann, A. The Family Oxalobacteraceae. [Internet]. 2014. [15 jun 2018]. The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. p 919-974. Disponible en: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-30197-1_291

⁶⁵Huang Y, Wei Z, Danzeng W, Zhang Y. *Sphingomonas antarctica* sp. nov., isolated from Antarctic tundra soil. [Internet]. 2017. [23 jun 2018]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 67: 4064-4068. Disponible en:

<http://ijs.microbiologyresearch.org/pubmed/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002253>

- ⁶⁶Obata H, Muryoi N, Kawahara H, Yamade K, Nishikawa J. Identification of a Novel Ice-Nucleating Bacterium of Antarctic Origin and its Ice Nucleation Properties. [Internet]. 1999. [23 jun 2018]. Cryobiology. 38(2):131-139. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224099921569?via%3Dihub>
- ⁶⁷Martino C. Estudio de bacterias del género Pseudomonas en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: Análisis del efecto de los polihidroxicanoatos. [Internet]. 2015. [23 jun 2018]. dissertation. Universidad de Buenos Aires. 149P. Disponible en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/qsdl-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_5752_DiMartino
- ⁶⁸Guerrero L, Pinta M, Fernández I, Ibargüen M, Hidalgo S, Burbano E. Eficiencia en la reducción de Cromo por una bacteria silvestre en un tratamiento tipo Batch utilizando como sustrato agua residual del municipio de Pasto, Colombia. [Internet]. 2017. [2 jul 2018]. Univ. Salud. 19(1): 102-115. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v19n1/0124-7107-reus-19-01-00102.pdf>
- ⁶⁹López de Mesa J, Quintero G, Guevara A, Jaimes D, Gutiérrez S. et al. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. [Internet]. 2006. [2 jul 2018]. Nova - publicación científica issn:1794-2470 vol.4 no. 5: 1-116. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS1_5.pdf
- ⁷⁰Ahmadi M, Afshin J, Ali M, et al. Bacillus flexus strain As-12, a new arsenic transformer bacterium isolated from contaminated water resources. [Internet]. 2017. [2 jul 2018]. Chemospher. Volume 169. pag 636-641.

Disponible

en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516316721>

- ⁷¹ González R. Diarium usal. [Internet]. 2005. [15 jul 2018]. [Internet Blog].
Disponible en: <http://diarium.usal.es/raulrg/2012/05/25/%C2%BFcuantas-especies-hay-en-nuestro-planeta/>
- ⁷² Lagunas J, Zavaleta E, Osada S, Aranda S et al. *Bacillus firmus* como Agente de Control Biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [Internet]. 2005. [8 jul 2018]. .Revista Mexicana de Fitopatología. 2001. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/612/61219108/>
- ⁷³ Takahashi S, Tomita J, Nishioka K , Hisada T, Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. PLoS One. 2014 Aug 21;9(8):e105592. doi: 10.1371/journal.pone.0105592. eCollection 2014.
- ⁷⁴ Covacevich, F, Silva, RI, Cumino, AC, Caló, G, Negri, RM, & Salerno, GL. First archaeal rDNA sequences from Argentine coastal waters: Unexpected PCR characterization using eukaryotic primers. *Cienc. mar* [online]. 2012, vol.38, n.2, pp.427-439. ISSN 0185-3880. 38(2), 427-439. Retrieved January 13, 2018, from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802012000300007&lng=en&tlng=
- ⁷⁵ Hugerth, L.W., Wefer, H.A., Lundin, S., Jakobsson, H.E., Lindberg, M., Rodin, S., Engstrand, L., Andersson, A.F., 2014. DegePrime, a program for degenerate primer design for broadtaxonomic-range PCR in microbial ecology studies. *Applied Environmental Microbiology*. 80:5116-5123.
- ⁷⁶ Burki F. The Eukaryotic Tree of Life from a Global Phylogenomic Perspective. [Internet]. 2014. [8 jul 2018]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.

6(5):a016147. Disponible en:

<http://cshperspectives.cshlp.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=24789819>

⁷⁷ González R. Diarium usal. [Internet]. 2005. [15 jul 2018]. [Internet Blog].

Disponible en: <http://diarium.usal.es/raulrg/2012/05/25/%C2%BFcuantas-especies-hay-en-nuestro-planeta/>

⁷⁸ Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, et al. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. [Internet]. 2015. [15 jul 2018]. PLOS ONE 10(6): e0130114. Disponible en:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130114>

⁷⁹ Øvstedal, D. Lewis S. Lichens of Antarctica and South Georgia. A guide to their identification and ecology. [Internet]. 2001. [15 jul 2018]. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 411 pp. Disponible en:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1657/1523-0430%282003%29035%5B0410%3ABR%5D2.0.CO%3B2>

⁸⁰ Ochyra, R. Lewis S. Bednarek H. 2008. Illustrated moss flora of Antarctica. [Internet]. 2008. [15 jul 2018]. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 704 pp. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2706733/>

⁸¹ Sancho L, Pintado A. Ecología vegetal en la Antártida. [Internet]. 2011. [27 jul 2018]. Ecosistemas. 20 (1): 42-53. Disponible en:

<https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/12>

⁸² Andreoli C, Moro I, La Rocca N, Dalla L, Masiero L, Rascio N. Ecological, physiological, and biomolecular surveys on microalgae from Ross Sea (Antarctica), [Internet]. 2000. [27 jul 2018]. Italian Journal of Zoology. Disponible en:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11250000009356370>

- ⁸³Sánchez OI. Maíz I (Zea mays). Reduca (Biología). [Internet]. 2014. [3 ago 2018]. Serie Botánica. 7 (2): 151-171. Disponible en: <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1739>
- ⁸⁴Valdés J. Sedimentos marinos. Juan Díaz Naveas editor. Geología marina. Leopoldo Toro. Valparaíso – Chile. [Internet]. 2010. [3 ago 2018]. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso - Servicio Nacional de Geología y Minería de Chile; P 48-58
- ⁸⁵Isla E, Pérez E, Porte C. Toxic anthropogenic signature in Antarctic continental shelf and deep-sea sediments. [Internet]. 2018. [3 ago 2018]. Scientific Reports. 8:9154. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27375-4/email/correspondent/c1/new>
- ⁸⁷Bernie Y. La Antártida se derrite y las moscas domésticas están tomando el control. [Internet]. 2017. [17 ago 2018]. Univision noticias. Disponible en: <https://www.univision.com/noticias/planeta/la-antartida-se-derrite-y-las-moscas-domesticas-estan-tomando-el-control>
- ⁸⁷Emerson J, Adams R, Román C, et al. Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. [Internet]. 2017. [17 ago 2018]. Microbiome.5:86. doi:10.1186/s40168-017-0285-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28810907>
- ⁸⁸Mesquida F. Las levaduras de la Antártida podrían ser una excelente fuente de biodiesel. [Internet]. 2017. [20 ago 2018]. Infocampo. [Internet]. Disponible en: <http://www.infocampo.com.ar/las-levaduras-de-la-antartida-podrian-ser-una-excelente-fuente-de-biodiesel/>
- ⁸⁹Medina J, García F, Paricaguan B. Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del Estado Falcón. [Internet]. 2014. [20 ago 2018]. Revista Ingeniería UC. Vol. 21, No. 1, 62-69. Disponible en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/ingenieria/revista/v21n1/art06.pdf>

- ⁹⁰Hernández G, Álvarez N, Ríos L. Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática. [Internet]. 2016. [22 ago 2018]. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera (Colombia), 18(1):139-159. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v18n1/v18n1a09.pdf>
- ⁹¹Duca G, Nuñez C, Navarro A. biorremediación de níquel (ii) en solución acuosa por *Aspergillus Niger* Gc1. [Internet]. 2012. [25 jul 2018]. Boletín Micológico Vol. 27 : 03 – 07. Disponible en:
<http://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/889>
- ⁹²Beltrán, M. & Gómez, A. (2015). Metales pesados (Cd, Cr y Hg): su impacto en el ambiente y posibles estrategias biotecnológicas para su remediación. [Internet]. 2015. [25 jul 2018]. Revista 2(2), 82 – 112 p. Disponible en:
<http://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/reiv3/article/view/113>
- ⁹³Ald, S.M. et al. (2007) Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists, Syst. [Internet]. 2007. [25 jul 2018]. Biol. 56(4), 684–689. Disponible en:
<https://academic.oup.com/sysbio/article/56/4/684/1685317>
- ⁹⁴Worden AZ, Dupont C, Allen AE. Genomes of uncultured eukaryotes: sorting FACS from fiction. [Internet]. 2011. [25 jul 2018]. Genom biology. 12 (6): 117. Disponible en:
<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-6-117>

ANEXOS

Anexo 1. Lista de partes del Tratado Antártico

 Lista de Partes					
Estado	Entrada en vigor	Status consultivo	Protocolo Ambiental	CCFA	CCRVMA
Alemania	05 Feb 1979	03 Mar 1981	14 Ene 1998	X	X
Argentina	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
Australia	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
Austria	25 Ago 1987				
Belarús	27 Dic 2006		15 Ago 2008		
Bélgica	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
Brasil	16 May 1975	27 Sep 1983	14 Ene 1998	X	X
Bulgaria	11 Sep 1978	05 Jun 1998	21 May 1998		X
Canada	04 May 1988		13 Dic 2003	X	X
Chile	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
China	08 Jun 1983	07 Oct 1985	14 Ene 1998		X
Colombia	31 Ene 1989				
Corea RDC	28 Nov 1986	09 Oct 1989	14 Ene 1998		X
Corea RDPC	21 Ene 1987				
Cuba	16 Ago 1984				
Dinamarca	20 May 1965				
Ecuador	15 Sep 1987	19 Nov 1990	14 Ene 1998		
España	31 Mar 1982	21 Sep 1988	14 Ene 1998		X
Estados Unidos	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
Estonia	17 May 2001				
Federación de Rusia	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
Finlandia	15 May 1984	20 Oct 1989	14 Ene 1998		X
Francia	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
Grecia	08 Ene 1987		14 Ene 1998		X
Guatemala	31 Jul 1991				
Hungría	27 Ene 1984				
India	19 Ago 1983	12 Sep 1983	14 Ene 1998		X
Islandia	13 Oct 2015				
Italia	18 Mar 1981	05 Oct 1987	14 Ene 1998	X	X
Japón	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
Kazajstán	27 Ene 2015				
Malasia	31 Oct 2011		14 Sep 2016		
Mónaco	31 May 2008		31 Jul 2009		
Mongolia	23 Mar 2015				
Noruega	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
Nueva Zelanda	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998		X
Países Bajos	30 Mar 1967	19 Nov 1990	14 Ene 1998		X

Pakistán	01 Mar 2012		31 Mar 2012		X
Papúa Nueva Guinea	16 Mar 1981				
Perú	10 Abr 1981	09 Oct 1989	14 Ene 1998		X
Polonia	23 Jun 1961	29 Jul 1977	14 Ene 1998	X	X
Portugal	29 Ene 2010		10 Oct 2014		
Reino Unido	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
República Checa	01 Ene 1993	01 Abr 2014	24 Sep 2004		
República de Eslovaquia	01 Ene 1993				
Rumania	15 Sep 1971		05 Mar 2003		
Sudáfrica	23 Jun 1961	23 Jun 1961	14 Ene 1998	X	X
Suecia	24 Abr 1984	21 Sep 1988	14 Ene 1998		X
Suiza	15 Nov 1990		01 Jun 2017		
Turquía	24 Ene 1996		27 Oct 2017		
Ucrania	28 Oct 1992	04 Jun 2004	24 Jun 2001		X
Uruguay	11 Ene 1980	07 Oct 1985	14 Ene 1998		X
Venezuela	24 Mar 1999		31 Ago 2014		

Source: Antarctic Treaty Secretariat (www.ats.aq)

Anexo 2. Proyectos de investigación desarrollados en el “Crucero Expedición de Colombia a la Antártida 2016 - 2017”.

No. Proyecto^a	Nombre del proyecto (Investigador de proyecto a bordo del buque)	Institución (es) participantes
1 (1)	"ICEMAN" Investigación científica marina para la seguridad marítima en la Antártica.	1A - DIMAR -Hidrografía
		1B - DIMAR -Oceanografía
		1C - DIMAR –Biología y Química
		1D - DIMAR - propiedades bio-ópticas
2 (7)	Biodiversidad y condiciones oceanográficas del Estrecho de Gerlache “BioGerlache –Antártica”	INVEMAR
3 (9)	Censo, ecología trófica, concentraciones de mercurio y genética de pinnípedos en algunas zonas poco estudiadas en el Estrecho de Gerlache Península Antártica	Comisión Colombiana del Océano, Universidad de los Andes - Universidad Javeriana
4 (10)	Origen y Biogeografía de Fauna Marina Bentónica Considerando Algunas Áreas en la Antártica	Comisión Colombiana del Océano, Universidad de los Andes
5 (16)	Composición estructural de la comunidad planctónica asociada a masas de agua del gradiente latitudinal desde el Océano Pacífico Colombiano hasta la Península Antártica 2016 – 2017	Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, AQUABIÒSFERA S.A.S, Universidad de Antioquia, INVEMAR
6 (17)	Programa de investigación en mamíferos marinos antárticos	Fundación Malpelo, Conservación Internacional, Fundación Omacha, Fundación Yubarta, Universidad de los Andes, Comisión Colombiana del Océano
7 (18)	Hidrodinámica y masas de agua del Pacífico Sur Americano y su conexión con las aguas antárticas en el verano austral de 2016 - 2017 (Fase II)	Escuela Naval de Cadetes “Almirante Padilla”.
8 (25)	Estudio de atenuación de parámetros del oleaje bajo la dinámica de hielo flotante en la Antártida	Escuela Naval de Cadetes “Almirante Padilla”.
9 (26)	Análisis de variación del nivel medio del mar en la Antártica y el Caribe y Pacífico colombiano a partir de datos de altimetría y datos in situ durante el verano austral 2016-2017	Escuela Naval de Cadetes “Almirante Padilla”.
10 (33)	Análisis comparativo de corte y soldadura submarina aplicada en ambiente extremos de bajas temperaturas vs los utilizados en el trópico, cuyos resultados permitirán el posible desarrollo de nuevas técnicas, procedimientos y herramientas	Escuela de Buceo y Salvamento - Escuela Naval de Suboficiales “ARC Barranquilla”
11 (39)	Estudio sobre el manejo de la coordinación visomotora en pilotos de embarcaciones menores durante maniobras navales bajo sensación térmica en la Antártica	Escuela de Formación de Infantería de Marina

12 (40)	Variables asociadas a la alimentación del hombre colombiano frente a la adaptación y supervivencia en condiciones adversas bajo temperaturas extremas en la Antártica	Escuela de Formación de Infantería de Marina
13 (2.1)	Estudio del Comportamiento de Materiales Metálicos de Uso Naval en Condiciones Propias de la Permanencia en el Ambiente Antártico	COTECMAR
14 (5)	Simulación de navegación en aguas antárticas: una herramienta para análisis, p entrenamiento naval	Escuela Naval de Cadetes "Almirante Padilla".
15 (8)	Concentración de hidrocarburos aromáticos polo cíclicos y metales pesados en krill antártico (Euphasia superba)	Universidad de Antioquia, DIMAR
16 (22)	Estudio Geológicos en Antártica	ACCEFYN
17 (30)	Microorganismos de ambientes extremos de la Antártida como una fuente potencial de compuestos con aplicación a nivel industrial y/o farmacológico.	ACCEFYN, Universidad de la Sabana
18 (28)	Variabilidad en la termodinámica de las aguas superficiales del estrecho de Gerlache y de regiones marinas de Colombia, asociada al calentamiento global y a la teleconexión entre el Niño Oscilación del Sur, la Oscilación Atlántico Norte y la oscilación Antártica.	Universidad Nacional de Colombia
19 (44)	España. Medidas con georadar isla Linvingston.	Comité Polar Español

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de muestra de suelo

ZR SOIL MICROBE DNA MINIPREP

PREPROTOCOLO:

-Alistar columnas tapa verde ZYMO-SPIN IV-HCR SPIN FILTERS

1. Cortar la base del tubo
2. Poner un tubo de recolección
3. Centrifugar exactamente 8000 g por 3 minutos (Añadir 300-400 ul de agua esteril antes de centrifugar)

PROTOCOLO:

1. Añadir 250 mg de muestra a un tubo ZR BASHINGBEAD LYSIS. Añadir 800 ul de LYSIS SOLUTION al tubo
2. Procesar vortex por 40 min.
3. Centrifugar 10000 g/min por 1 min.
4. Transferir 400 ul de sobrenadante a un ZYMO SPIN IV SPIN FILTER (Tapa naranja) en un tubo de recolección y centrifugar 7000 g por 1 min, quitar base del tubo.
5. Agregar 1200 ul de SOIL DNA BINDING BUFFER a el filtrado en el tubo de recolección del paso 4.
6. Transferir 800 ul de la mezcla del paso 5 a un tubo de recolección ZIMO SPIN IIC y centrifugar a 10000 g por 1 min.
7. Descartar el filtrado y repetir el paso 6.
8. Agregar 200 ul de DNA PRE-WASH BUFFER al ZIMO SPIN IIC COLUMN en un nuevo tubo de recolección y centrifugar 10000 g por 1 min.

9. Agregar 500 ul de DNA WASH BUFFER al ZIMO SPIN IIC COLUMN y centrifugar 10000 g por 1 min.
10. Transferir el ZYMO SPIN IIC COLUMN a un tubo ependorf de 1.5 ml y agregar 100 ul (35 ul mínimo) de DNA ELUTION BUFFER directamente a la matriz de la columna. Centrifugar 10000 g por 1 min.
11. Transferir el DNA eludado del paso 10 al preparado ZYMO SPIN IV-HCR SPIN FILTER (Tapa Verde) en un ependorf limpio y centrifugar exactamente 8000 g por 1 min