

Composición de la comunidad microbiana y rol trófico a lo largo de un marcado gradiente de salinidad en la Laguna Puilar, Salar de Atacama, Chile



Cristina Dorador , Patricio Fink , Marta Hengst , Gonzalo Icaza , Álvaro S. Villalobos , Drina Véjar , Daniela Meneses , Vinko Zadjelovic , Lisa Burman , Jana Moelzner , Chris Harrod 

Recibido: 19 de marzo de 2018 / Aceptado: 23 de abril de 2018 / Publicado en línea: 9 de mayo de 2018
- Springer International Publishing AG, parte de Springer Nature 2018

Resumen Las características geológicas, hidrológicas y microbiológicas del Salar de Atacama, la cuenca sedimentaria evaporítica más extensa del desierto de Atacama en el norte de Chile, han sido ampliamente estudiadas. Por el contrario, se ha prestado relativamente poca atención a la composición y las funciones de las comunidades microbianas en los lagos hipersalinos, que son una característica única del Salar. En el presente estudio se utilizaron herramientas bioquímicas, químicas y biológicas moleculares para determinar la composición y roles de las comunidades microbianas en agua, mantos microbianos y sedimentos a lo largo de un marcado gradiente de salinidad en la Laguna Puilar.

que se encuentra en la Reserva Nacional "Los Flamencos". Las comunidades bacterianas en los sitios de muestreo estaban dominadas por miembros de los filos Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacterias y Proteobacterias. Los análisis de isótopos estables y ácidos grasos revelaron una marcada variabilidad en la composición de las capas microbianas en diferentes sitios de muestreo, tanto horizontalmente (en diferentes sitios) como verticalmente (en las diferentes capas). Se demostró que la Laguna Puilar es un ecosistema dominado por microbios en el que más del 60% de los ácidos grasos en sitios particulares son de origen bacteriano. Nuestros estudios pioneros también sugieren que los presupuestos energéticos de los consumidores aviares (tres especies de flamencos) y los invertebrados dominantes (anfípodos y gasterópodos) utilizan minerales como fuente de energía y nutrientes. En general, los resultados de este estudio apoyan la

Material complementario electrónico La versión en línea de este artículo (<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1091-z>) contiene material complementario, que está disponible para los usuarios autorizados.

C. Dorador - G. Icaza - AS Villalobos - D. Vejar - D. Meneses - V. Zadjelovic Laboratorio de Complejidad Microbiana y Ecología Funcional, Instituto Antofagasta, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile

C. Dorador (&) Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos, Universidad de Antofagasta, Angamos 601, Antofagasta, Chile
correo electrónico: cristina.dorador@uantof.cl

C. Dorador - M. Hengst - G. Icaza - D. Vejar - D. Meneses Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), Santiago, Chile

P. Fink - L. Burmann - J. Moelzner Grupo de trabajo Ecología química acuática, Universidad de Colonia, Colonia Biocenter, Zùlpicher Straße 47b, 50674 Colonia, Alemania

M. Hengst Laboratorio de Ecología Molecular y Microbiología Aplicada, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Católica del Norte, Antofagasta, Chile

C. Harrod Instituto de Ciencias Naturales Alexander von Humboldt, Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile

Consideran que el Salar de Atacama es un ecosistema heterogéneo y frágil donde pequeños cambios en las condiciones ambientales pueden alterar el equilibrio de las comunidades microbianas con posibles consecuencias en los diferentes niveles tróficos.

Palabras clave Halófilos - Isótopos estables - Ácidos grasos - Mats microbianos - Secuenciación del gen 16S rRNA - Flamencos

Introducción

El Salar de Atacama es la cuenca evaporítica más grande del desierto de Atacama en el norte de Chile. Este Salar ocupa una superficie de 18.100 km² y se encuentra a 2300 msnm entre las latitudes 22-20° al 24-10° S. El Salar tiene una superficie de 3000 km² y superficie lagunar que alcanza los 12,6 km² (Risacher et al. 1999). El origen de la Cuenca del Salar de Atacama es tectónico, donde en la parte más austral existen depósitos de sedimentos clásticos y evaporíticos que se mezclan con materiales dendríticos y salinos en los bordes.

El Salar de Atacama ha sido definido como una cuenca de sedimentación donde la depresión central está ocupada por una costra de halita (NaCl) de 1100 km² de superficie y 900 m de profundidad, que está rodeada de limo salino de 2000 km² de superficie (Risacher et al. 1999). Se ha dicho que por la pureza de sus sales, el núcleo del Salar de Atacama no es de paleolagos antiguos, sino de aportes subterráneos. La precipitación en esta zona se concentra en el verano austral, y alcanza hasta 25 mm/año; sin embargo, la evaporación potencial es de ca. 2000 mm/año, resultando en un balance hídrico negativo (Risacher y Alonso 1996). Las diferencias de temperatura durante el día y la noche son amplias y la humedad relativa media es de ca. 50%, la velocidad media del viento alcanza los 10 m/s a 0,4 m sobre el suelo, y generalmente tiene dirección oeste (DGA 1991).

C. Harrod
Núcleo Milenio INVASAL, Concepción, Chile

AS Villalobos
Microbiología marina, GEOMAR Helmholtz, Centro de Investigación Oceánica Kiel, Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel, Alemania

El Salar de Atacama ha sido ampliamente estudiado en cuanto a su geología, hidrogeología y mineralogía, lo que refleja su importancia económica, ya que en la zona sur del Salar se encuentran grandes depósitos de litio. Los principales afluentes superficiales de la cuenca son los ríos San Pedro y Vilama ubicados en la parte norte del Salar, donde se estima que el 40% del total de los vertidos superficiales son utilizados por la agricultura (Mardones 1997). El Salar de Atacama recibe importantes aportes subterráneos de agua del Este y Sur (manantiales) originados por las formaciones volcánicas de los Andes. Existen varios tipos de cuerpos de agua en la cuenca: (i) manantiales de agua dulce y salada, (ii) lagunas salinas y (iii) ríos en la zona noroeste. Los componentes disueltos en las aguas tienen dos orígenes principales: la alteración de rocas volcánicas aporta K, Li, Mg, B y una baja concentración de Na y Ca, mientras que la redisolución de sales antiguas (bajo formaciones volcánicas) hacen un importante aporte de Na, Cl, Ca y SO₄ en las aguas más salinas (Risacher y Alonso 1996).

Los estudios microbiológicos en el Salar de Atacama comenzaron a principios de la década de 1990 con descripciones de comunidades de cianobacterias en la Laguna Tebenquiche (Zúñiga et al. 1991). Campos (1997) reportaron varios aislamientos de diferentes sitios del Salar de Atacama incluyendo bacterias halófilas moderadas: *Marinomonas*, *Vibrio*, *Alteromonas*, *Marinococcus*, *Acinetobacter* bacterias halotolerantes: *Bacilo*, *Pseudomonas-Deleya*, *Micrococcus* *Acinetobacter*. Los estudios en la Laguna Tebenquiche han llevado al aislamiento de *Halorubrum tebenquichense*, una arquea extremadamente halófila (Lizama et al. 2002) y *Cromohalobacter nigrandesensis*, una bacteria moderadamente halófila miembro de la *Halomonadaceae* (Prado et al. 2006). Esta bacteria está estrechamente relacionada con *Cromohalobacter sarencensis*, previamente aislado de la gran altitud (4300 m) del lago salino Laguna Verde ubicado en el suroeste de Bolivia (Quillaguamán et al. 2004).

En las últimas décadas, el uso de métodos de cultivo independientes ha revelado niveles previamente inesperados de diversidad microbiana en diferentes cuerpos de agua del Salar. Demergasso et al. (2004) usando técnicas basadas en PCR-DGGE reportaron un predominio de *Proteobacterias*, *Bacteroidetes*, bacterias Gram positivas de alto GC y *Haloarquea* en Laguna Cejar, Tebenquiche y Burro Muerto en el Salar de Atacama. Estudios posteriores en la Laguna Tebenquiche destacaron la novedad de

bacteriano taxones, incluido Bacteroidetes y Las gammaproteobacterias (Demergasso et al.2008). Bacteroidetes ha sido ampliamente descrito como el filo bacteriano más frecuente en los cuerpos de agua del Salar de Atacama y otros sistemas acuáticos del Altiplano (Dorador et al.2010). Otros estudios han revelado tasas de producción de metano a partir de tapetes microbianos en Laguna Cejar y Laguna Chaxa en el Salar de Atacama, revelando una fluctuación entre 7,8 y 30,4 nmol g/día (Kelley et al.2014). Curiosamente, Rey (2015) reveló la producción microbiana de CO de la Laguna Cejar y recientemente reportó el aislamiento de Natronorubrum C29, una arquea halófila capaz de oxidar el monóxido de carbono (McDuff et al. 2016). El uso de genes funcionales (pufM) ha permitido la identificación de bacterias fototróficas anoxigénicas de Laguna Tebenquiche y Laguna Chaxa, exhibiendo la presencia de fototrofos adaptados a altas concentraciones de sal, es decir, halocromatios, tiorhalocapsas, ectotiorodospiray halorodospira (Thiel et al.2010).

Se ha examinado la composición microbiana de diferentes estructuras presentes en los lagos del Salar de Atacama. Recientemente, se han analizado tapetes microbianos, evaporitas de yeso y microbiotas de carbonato utilizando técnicas de secuenciación de ADN de próxima generación con un predominio informado de proteobacteria en Laguna Tebenquiche y Laguna La Brava, un lago hipersalino ubicado en la parte sur del Salar de Atacama y cerca de las instalaciones de extracción de litio (Fariás et al. 2014). En la Laguna Tebenquiche, el estudio de diferentes tapetes microbianos detectó una alta abundancia relativa de arqueas (ordenar halobacteriales) más bien que bacterias, sin embargo, aunque grupos bacterianos como Planctomycetes, Gammaproteobacteria (Chromatiales) y Firmicutes son abundantes en diferentes muestras (Fernandez et al.2016). En Laguna La Brava, la diversidad microbiana estuvo dominada por Euryarchaeota, Crenarchaeota y Firmicutes en tapetes no litificantes, mientras que en microbianitos, altas proporciones de planctomycetes fueron reportados (Fariás et al.2017). Se estudió la diversidad bacteriana de los tapetes microbianos de Laguna Cejar utilizando pirobibliotecas detectando una dominancia de Proteobacterias (Rhodospirillaceae, Desulfobacteraceae), Aminicenantes (ex-OP8) y Firmicutes (Rasuk et al.2016).

A pesar de los crecientes esfuerzos recientes para caracterizar la diversidad microbiana en diferentes estructuras de los lagos del Salar de Atacama, pocos estudios han examinado la

papel funcional de los microbios a nivel de ecosistema, por ejemplo, cuál es su papel potencial en el suministro de energía y nutrientes a los consumidores. Esto es potencialmente importante, dado el papel del Salar de Atacama como hábitat clave para tres especies de flamencos que son motivo de preocupación para la conservación (flamenco andino *Phoenicoparrus andino*, flamenco chileno *Phoenicoparrus chilensis* y el flamenco de James *Phoenicoparrus jamesi*). En este estudio caracterizamos la composición de las comunidades microbianas asociadas con diferentes características clave del Salar (esteras, sedimentos y biopelículas) a lo largo de un marcado gradiente de salinidad en la Laguna Puillar, parte del sistema hidrológico Soncor, ubicada en la Reserva Nacional Los Flamencos, un área protegida y sitio Ramsar (Ortiz et al.2013). También caracterizamos los perfiles de ácidos grasos y C (d₁₃C) y N (d₁₅N) valores de isótopos estables de las diferentes características, así como otros productores primarios potenciales y consumidores abundantes (anfípodos y gasterópodos: FAA, SIA, flamenco: SIA) para examinar la supuesta contribución de materiales derivados de microbios a la dieta de estos consumidores. También nos propusimos hacer un primer examen de la utilidad de los dos enfoques bioquímicos diferentes para caracterizar la estructura y la actividad de la comunidad microbiana en los ecosistemas de Salar.

materiales y métodos

Descripción de Laguna Puillar

El sistema hidrológico de Soncor está formado por una serie de cuatro lagunas permanentes poco profundas interconectadas: Burro Muerto (1 ha), Chaxa (37 ha), Barros Negros (103 ha) y Puillar, que está formada por una serie de espejos lacustres (Fig. 1). Durante el invierno austral de 2013 (junio), tomamos muestras de la Laguna Puillar en el Salar de Atacama y realizamos muestreos adicionales en 2014 (mayo) para análisis químicos. La laguna (Fig. 1) tiene un gradiente de salinidad corto pero extremo que va desde aguas ligeramente salobres (P01) hasta condiciones hipersalinas (P04) (Tablas 1, 2). Cianobacterias coloniales (p. ej., Nostoc) y extensas alfombras microbianas están presentes en toda la laguna. Los macrófitos están presentes pero son raros y disminuyen en abundancia con el aumento de la salinidad. Se pueden observar diferentes especies de aves alimentándose en las superficies de sedimentos sumergidos de la laguna y construyendo nidos y criando crías en áreas directamente adyacentes a la laguna junto con otras aves como la gaviota andina (Larús

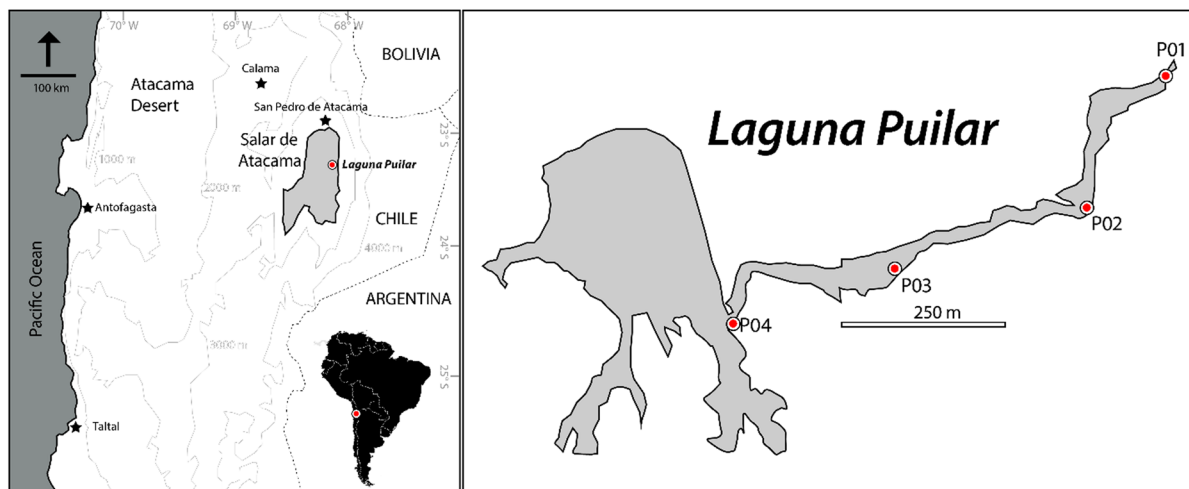


Figura 1 Laguna Puilar en Salar de Atacama, norte de Chile

tabla 1 Características físicas y químicas de los sitios de muestreo en la Laguna Puilar

Sitios	Descripción	Temperatura del agua (-C)	Salinidad (mg/L)	pH	Ubicación
P01	Primavera	14.2	107	8	23-18.137oS, 68-08.261oW
P02	Canal (15 cm de	12.7	147	8.01	23-18.198oS, 68-08.324oW
P03	profundidad) Canal	15.9	151	8.3	23-18.293oS, 68-08.437oW
P04	lago principal	18.6	162	8.11	23-18.354oS, 68-08.643oW

serrano) y ganso andino (*Chloehaga melanoptera*) (Ficha Informativa sobre Humedales Ramsar 2006–2008).

Muestreo

Tomamos muestras de agua, tapetes microbianos, sedimentos, macrófitos, *Nostoc*, anfípodos, gasterópodos y plumas de flamenco de cuatro sitios (P01–4) ubicados a lo largo de ca. Gradiente de salinidad de 750 m (Fig. 1). Las esteras microbianas y las muestras de sedimento se tomaron en tubos de plástico estériles y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis. Las muestras se obtuvieron cuidadosamente utilizando una espátula estéril y jeringas de diferentes capas de tapetes microbianos siguiendo su perfil vertical, teniendo en cuenta las diferentes capas de colores de los tapetes microbianos (rosa, verde, púrpura). Otras muestras fueron llevadas al laboratorio y procesadas para análisis de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ y ácidos grasos. Las plumas de los flamencos fueron arrastradas por el viento y no se pudieron asociar de manera confiable con un sitio en particular a lo largo de un transecto tan corto. Todas las muestras fueron almacenadas en hielo y transportadas a los laboratorios de

la Universidad de Antofagasta antes de ser dividida para los distintos análisis; las muestras para el examen de ADN se almacenaron congeladas a -80 °C para su posterior análisis.

Extracción y secuenciación de ADN

Los tapetes microbianos se recolectaron en los sitios P01–4 (Tabla 1). Las muestras P01 corresponden a una capa de biopelícula dura que cubre la roca; las muestras de P02–4 representan diferentes capas de tapetes microbianos. El ADN de las muestras de sedimentos se extrajo utilizando el kit de aislamiento de ADN PowerSoil (MoBio Laboratories, CA, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad y la pureza se ensayaron en un Nanodrop2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y la calidad se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% p/v. El gen 16S rDNA se amplificó con los cebadores 27F y 519R (regiones V1–3). La secuenciación se realizó en MR DNA (<http://www.mrdnab.com>) en un dispositivo de pirosecuenciación 454 (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de la secuenciación se obtuvieron como archivos *fasta-qual* y pipeline.

Tabla 2 Análisis químico de muestras de agua de la Laguna Puilar, Salar de Atacama

Elementos	Sitios de muestreo		
	P01	P02	P03
Nitrito (yog/L)	DAKOTA DEL NORTE	DAKOTA DEL NORTE	DAKOTA DEL NORTE
Nitrato (yog/L)	118.04	90.27	134.62
Amonio (yog/L)	34.95	35.32	65.33
Fosfato (yog/L)	376.09	405.56	398.94
Sulfato (mg/L)	389.37	293.28	361.93
Sílice (mg/L)	253.11	266.82	265.03
Nitrógeno total (yog/L)	177.78	302.23	405.65
fósforo total (yog/L)	1074.16	1032.49	953.32
Calcio (mg/L)	156.23	141.49	146.5
Magnesio (mg/L)	444.93	580.41	623.11
Sodio (mg/L)	4021.57	5172.66	5244.38
Potasio (mg/L)	743.84	965.71	1004.23
Cloruro (mg/L)	24.996,3	29.686,66	29.936,66
Dureza (mg/L)	1600	2300	2250
Alcalinidad total (mg/L)	3.55	3.8	3.4
Carbonato (mg/L)	9	9	18
Bicarbonato (mg/L)	216.55	231.8	207.4
Conductividad (yoS/cm)	15,000	17,600	17,411

DAKOTA DEL NORTE no detectado

Las secuencias se analizaron en QIIME v1.9.1 (Caporaso et al. 2010). Se verificó la calidad de las lecturas de secuenciación de un solo extremo utilizando la configuración predeterminada para la función `split_libraries_fastq.py` en QIIME. Las secuencias se alinearon con la base de datos SILVA (versión v128) y se agruparon en OTU bacterianas representativas utilizando la implementación `sortmerna/sumacust` de selección de OTU de referencia abierta con una similitud de secuencia del 97 %.

Análisis de isótopos estables

Las muestras para los análisis de isótopos estables se lavaron en agua destilada y luego se secaron en un horno a 60 °C durante al menos 24 h. Debido a problemas de contaminación con C inorgánico, algunas muestras (gasterópodos, sedimentos, capas microbianas) se dividieron y la mitad se trató con ácido clorhídrico 1 N para eliminar el carbono inorgánico (p. ej., en caparazones de gasterópodos), mientras que la segunda mitad de la muestra se retuvo sin tratar para la estimación de $d_{15}N$ (ya que el tratamiento con ácido puede afectar $d_{15}N$ valores N). Las muestras se molieron en un mortero de ágata y se pesaron en cápsulas de estaño. Espectrometría de masas de relación isotópica

(interpretado por www.oelabs.com) se utilizó para determinar el carbono estable ($d_{13}C$) y nitrógeno ($d_{15}N$) composición isotópica con una precisión de $\pm 0,1\%$ y expresado endnotación en % con respecto a los estándares establecidos internacionalmente.

Análisis de ácidos grasos

Las muestras de agua se filtraron en filtros de fibra de vidrio precombustidos inmediatamente después del muestreo y se congelaron a -20 °C para minimizar la oxidación de ácidos grasos altamente insaturados. Las muestras de biopelículas y sedimentos se liofilizaron antes de la extracción y se almacenaron en -20 °C hasta que se procese. Los lípidos totales se extrajeron de 2 a 5 mg (masa seca) de muestras liofilizadas con 10 mL de $CH_2Cl_2/MeOH$ (2:1 v/v) y se secó bajo una corriente de gas nitrógeno. La hidrólisis de los lípidos del residuo y la subsiguiente metilación de los ácidos grasos se lograron mediante incubación en 5 ml de HCl metanólico 3 N (Supelco) a 70 °C durante 20 min. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se extrajeron del ácido con 3 ml de isohexano y el disolvente se evaporó bajo una corriente de gas nitrógeno. Los residuos finales de FAME se volvieron a disolver en 100yoL de isohexano, de los cuales 1yoL se sometió a análisis cromatográficos de gases. Los análisis se realizaron en un sistema GC Agilent 6890N equipado con un detector de ionización de llama con helio como gas portador. Los FAME de origen eucariótico se separaron en una columna GC capilar DB-225 (J&W Scientific, Folsom, EE. UU.) y se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención con los de un estándar FAME (Supelco CRM47885). Para obtener detalles sobre los gradientes de temperatura de la columna y el horno, consulte Ghomi et al. (2014). Los BAME (FAME bacterianos) se separaron en una columna GC capilar HP-5 (J&W Scientific, Folsom, EE. UU.) y se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención con los de una mezcla estándar de BAME (Supelco 47080-U). El programa del horno GC para la separación de BAME fue el siguiente: 1 min a 60 °C, 30 °C/min a 160 °C, 4 °C/min a 200 °C, 20 °C/min a 280 °C con una retención final durante 1 min a 280 °C. Las cantidades relativas de FA (porcentaje del área total del pico) se estandarizaron entre los análisis FAME y BAME usando ácido palmítico (presente en los estándares FAME y BAME) como pico de referencia.

análisis estadístico

La variación en la composición de la comunidad asociada con los diferentes sitios (P01–4), el tipo de muestra (alfombra microbiana, sedimento, biopelícula) y la profundidad relativa de los estratos de las esteras microbianas (capa superficial = L1, capa más profunda = L4) se examinó utilizando coordenadas principales. (PCoA) ordenación de diferencias de Bray-Curtis de datos transformados de raíz cuadrada a través de PRIMER y PERMANOVA 7.0.13 (Anderson et al.2008). Este método permite una evaluación visual rápida de la similitud relativa de la composición de la comunidad microbiana entre las muestras, ya que los datos que se encuentran cerca del espacio de ordenación son más similares (Paliy y Shankar2016). También superpusimos múltiples vectores de correlación para mostrar la dirección y la fuerza de la relación entre la abundancia de phyla y los dos ejes canónicos, a fin de proporcionar una indicación de qué phyla probablemente impulsaban los patrones observados en la ordenación.

Utilizamos permutacional ($n_{\text{permutaciones}} = 9\,999$) análisis de varianza multivariante (PERMANOVA: Anderson2001; anderson et al.2008) para examinar si la composición de la comunidad microbiana variaba entre los tapetes microbianos y las biopelículas, y para los tapetes microbianos, entre los sitios P02, P03 y P04. Los datos de ácidos grasos también se trataron de manera similar, con la excepción del uso de la matriz de distancia euclidiana, como se recomienda para dichos datos (Happel et al. 2017). De nuevo, se generaron ordenaciones de PCoA y se superpusieron múltiples vectores de correlación para mostrar qué ácidos grasos estaban asociados con los patrones en los datos. Cuando teníamos datos tanto de ácidos grasos como moleculares para la misma muestra, también examinamos las correlaciones entre los datos de ácidos grasos y la abundancia de diferentes filos microbianos entre sitios y profundidad de capa, superponiendo vectores de correlación de datos moleculares (abundancia relativa de filos) en un PCoA de datos de ácidos grasos de muestras de esteras microbianas. Nos enfocamos en muestras de tapetes microbianos ya que la comparabilidad entre estas muestras era la más alta. Usamos PERMANOVA para examinar si los perfiles de ácidos grasos de la estera microbiana diferían entre los sitios P02, P03 y P04.

Los datos de isótopos estables se trazaron siguiendo la convención ($d_{15}\text{N}$ y $d_{13}\text{C}$) permitiendo la caracterización del origen y flujo de energía (C) y nutrientes (N) desde los productores primarios putativos (biofilm, macrófitos, tapetes microbianos) hasta los consumidores. Usamos PERMANOVA para examinar cómo los datos de isótopos estables

(basado en distancias euclidianas) diferían entre diferentes taxones y sitios. Las diferentes vías de producción primaria tienen características de valores de C , lo que permite identificarlos y estimar su contribución a una red alimentaria (Peterson y Fry1987). Generalmente, hay un cambio isotópico predecible (discriminación trófica) de ca. $\pm 1\%$ en C y 3% en N entre el alimento de un consumidor y sus tejidos (McCutchan et al.2003), lo que hace que los consumidores sean isotópicamente más pesados que su dieta asimilada a largo plazo. Usamos PERMANOVA para probar las diferencias isotópicas entre diferentes fuentes putativas de producción primaria y para examinar si había diferencias espaciales en los valores isotópicos dentro de (a) tapetes microbianos y (b) biofilm entre sitios.

Resultados

Características físicas y químicas de la Laguna Puilar

Laguna Puilar exhibió un gradiente de salinidad de 107–162 mg/L de salinidad entre los sitios P01 y P04 (Cuadro1). El sistema está dominado por iones de sodio (40,2–52,4 g/L) y cloruro (25–30 g/L). En algunos sectores del lago hay saturación total de sales (Cuadro 2). En orden creciente, las concentraciones de cationes son: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Si^{2+} , California^{2+} y anión son: Cl^- , ASi^- , QUE^- , HCO_3^- . Para nutrientes, nitro total los valores de generación oscilaron entre 177,8 y 405,7 $\mu\text{g/L}$ y el fósforo total osciló entre 953,3 y 1047,6 $\mu\text{g/L}$.

Invertebrados

Se encontraron pocos animales multicelulares en el sistema, siendo los más comunes los anfípodos (*hialellaspp.*), gasterópodos (*heleobiaspp.*) y moscas de salmuera (*Ephydriidae*), aunque no en todas las estaciones de muestreo. La densidad de gasterópodos y anfípodos disminuyó notablemente entre P01 y P03 y estuvieron completamente ausentes en el sitio hipersalino P04. Aunque grandes volúmenes de agua (150 L) fueron filtrados a través de una red de fitoplancton (20 μm), no encontramos ninguna artemia, la dieta putativa de los flamencos que se observan con frecuencia en la laguna. Se puede observar a estas aves alimentándose en las superficies de sedimentos sumergidos del

laguna y construir nidos y criar crías en áreas directamente adyacentes a la laguna. hialellalos anfípodos exhibieron tamaños corporales que oscilaron entre 1,5 y 4,5 mm, pero ni los isótopos estables ni los biomarcadores de ácidos grasos indicaron patrones específicos de tamaño en el uso de recursos entre las clases de tamaño de anfípodos (datos no mostrados). La altura de la concha deheleobiagasterópodos disminuyó significativamente (ANOVA de Kruskal-Wallis en rangos, $H = 69.6$, $df = 2$, $p \leq 0.001$) a lo largo del gradiente de salinidad de P01 a P03 (no se encontraron caracoles en P04), aunque los mecanismos subyacentes a este patrón siguen sin estar claros (Tabla3).

Comunidades microbianas

El número de unidades taxonómicas operativas (OTU) osciló entre 113 y 301 y el índice de diversidad de Shannon entre 3,86 y 6,86 en las muestras P01-1 y P04-1 respectivamente (Tabla3). La biopelícula de roca en el sitio P01 comprendía miembros de 14 filos bacterianos. Este sitio estaba dominado porCloroflexi (22–40%) y cianobacterias (31–43%) seguido deproteobacteria (13,3–23,3%) yBacteroidetes (6,3–21,3%; higos.2, 3). Concretamente, en la muestra P01-1 el 40% de la abundancia relativa correspondió a los géneros rosaiflexusy 19% aLeptolyngbya (Mesa4).planctomicetos se registraron en menor proporción (0,8–5,3% de abundancia relativa) yVerrucomicrobia (0,7-1,8%).

En cuanto a su abundancia relativa, siete filos fueron considerados semi-raros (0,1-0,5%) y raros ([0, 1%) (Pedrós-Alió2012) (Higo.4).

Se detectaron miembros de diecinueve filos bacterianos a partir de cuatro capas de diferentes profundidades de tapetes microbianos del sitio P02. En general, la diversidad bacteriana estuvo dominada por Proteobacterias (25,6–73,6%) yFirmicutes (8,6–35,2%; higos.2,3). En concreto, toda la comunidad estaba dominada por tres familias: Ectothiorhodospiraceae (Halorhodospira), Halomonadaceae (Salicola)y Halanaerobiaceae (Halanaerobium).En este sitio, la mayoría de los filos (13) se consideraron semi-raros y raros (Fig.4). Según los diferentes estratos, un aumento en la abundancia relativa deBacteroidetes (2,8–25,8%) y Cloroflexi (1.4–3.3%) fue evidente con mayor profundidad. para el caso deproteobacteria,el taxón dominante eraGammaproteobacteria (65,9-9,3%) que disminuyen con la profundidad.

Se recolectaron dos muestras de tapetes microbianos del sitio P03. Ambos exhibieron una alta abundancia relativa de cianobacterias (53,9–30,7%) yproteobacteria (22-32,7%), seguido deBacteroidetes (10-20,7%; higos.2,3). En estas muestras se detectaron miembros de 20 phyla, de los cuales 18 eran semirrígidos o raros (Fig.4). Los Bacteroidetes incluyen la presencia de nueve familias, destacando el predominio de Flavobacteriaceae.Otras familias frecuentes eran

Tabla 3Índice de diversidad alfa y métricas usando 454 pirosecuencias de la región V4 del rRNA 16S de muestras ambientales de Laguna Puillar, Salar de Atacama

Muestras	Lecturas sin procesar Lecturas filtradas posteriores al control de calidad		OTU	índice de diversidad alfa				
				Shannon	Chao1	simpson	AS	buena cobertura
P01-1	6023	5728	113	3.86	135	0.81	149	0.98
P01-2	5310	4940	211	5.14	314	0.90	311	0,95
P01-3	6731	6198	218	5.63	295	0.93	310	0,95
P01-4	3302	2712	154	5.14	186	0,92	180	0.98
P02-1	2163	1817	117	4.95	139	0.94	142	0.98
P02-2	6799	6369	136	4.95	196	0.93	203	0.97
P02-3	7481	7118	127	4.65	196	0.90	208	0.97
P02-4	3149	2915	274	6.97	362	0.98	331	0,95
P03-1	4354	3950	256	6.17	386	0,96	403	0.93
P03-2	4476	4284	158	4.00	194	0.72	204	0.97
P04-1	4454	3749	301	6.83	397	0.98	434	0.93
P04-2	6803	5435	291	6.79	369	0.98	401	0.94
Estera naranja	6034	5578	253	6.32	375	0.97	411	0.93

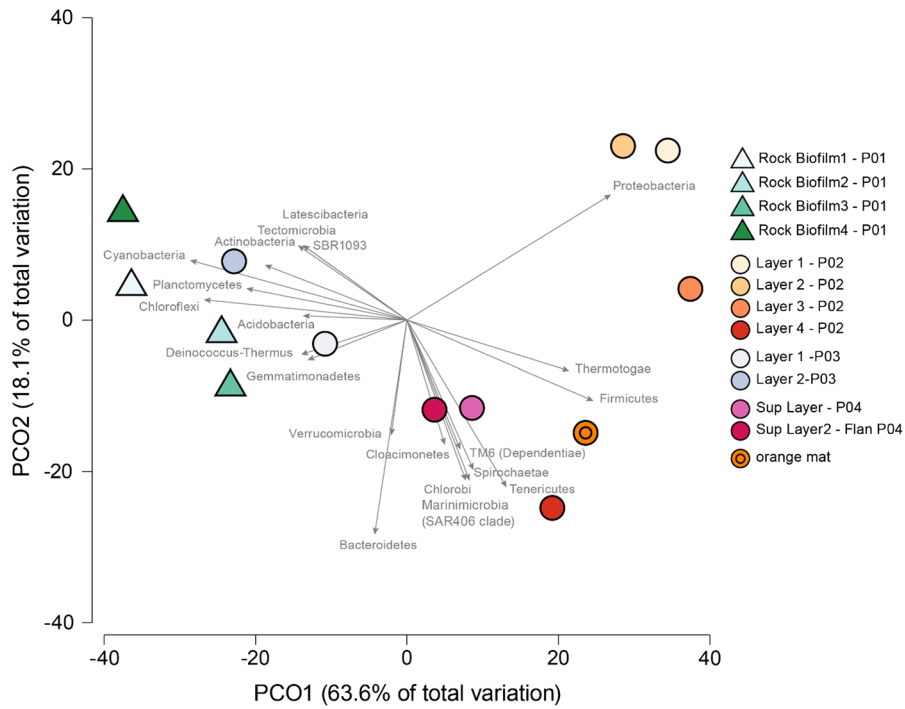


Figura 2 Ordenación PCoA de 454 datos de secuencia que muestran variación en la composición de la comunidad microbiana (nivel de filo) asociada con biopelícula, estera microbiana y sedimento superficial

muestras Los vectores muestran correlaciones entre la abundancia relativa de los diferentes filos y los dos ejes canónicos

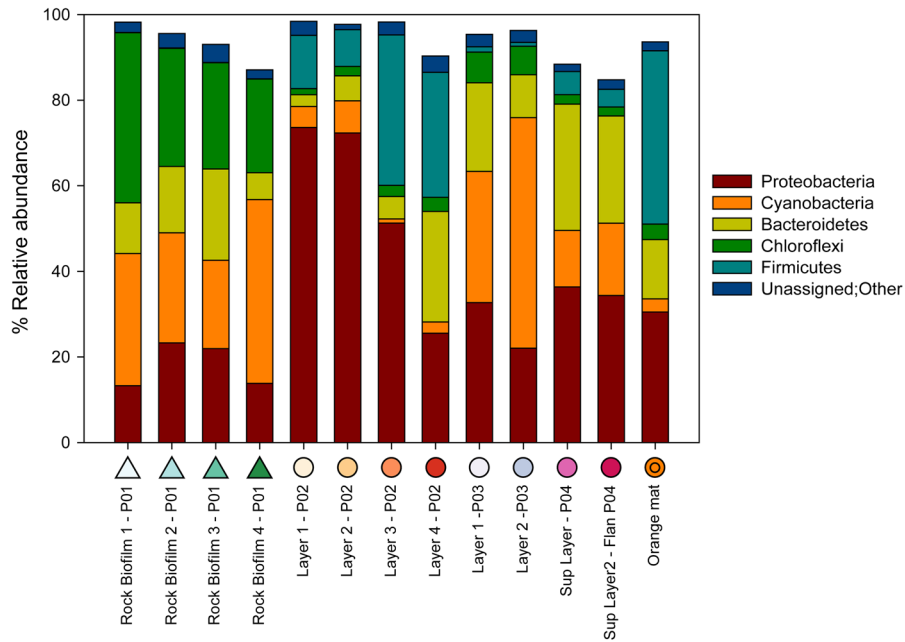


Fig. 3 Filos bacterianos más frecuentes en diferentes sitios y muestras de Laguna Puilar, Salar de Atacama.

Tabla 4 Géneros bacterianos más frecuentes en Laguna Puilar, Salar de Atacama

géneros	fila	Valores máximos de abundancia relativa total en muestras (%)
Pleurocapsa	cianobacterias	51.5
halorodospira	proteobacteria	45.7
rosaiflexus	cloroflexi	39.8
Halanaerobio	Firmicutes	33.7
Salicòla	proteobacteria	19.8
Leptolyngbya	cianobacterias	18.5
Idiomarina	proteobacteria	11.5
Truepera	Deinococcus-Thermus	10.8
rodomicrobio	proteobacteria	8.3
Spiribacter	proteobacteria	8.2
tiohalocapsa	proteobacteria	8.1
California. Alysiosphaera	proteobacteria	6.9

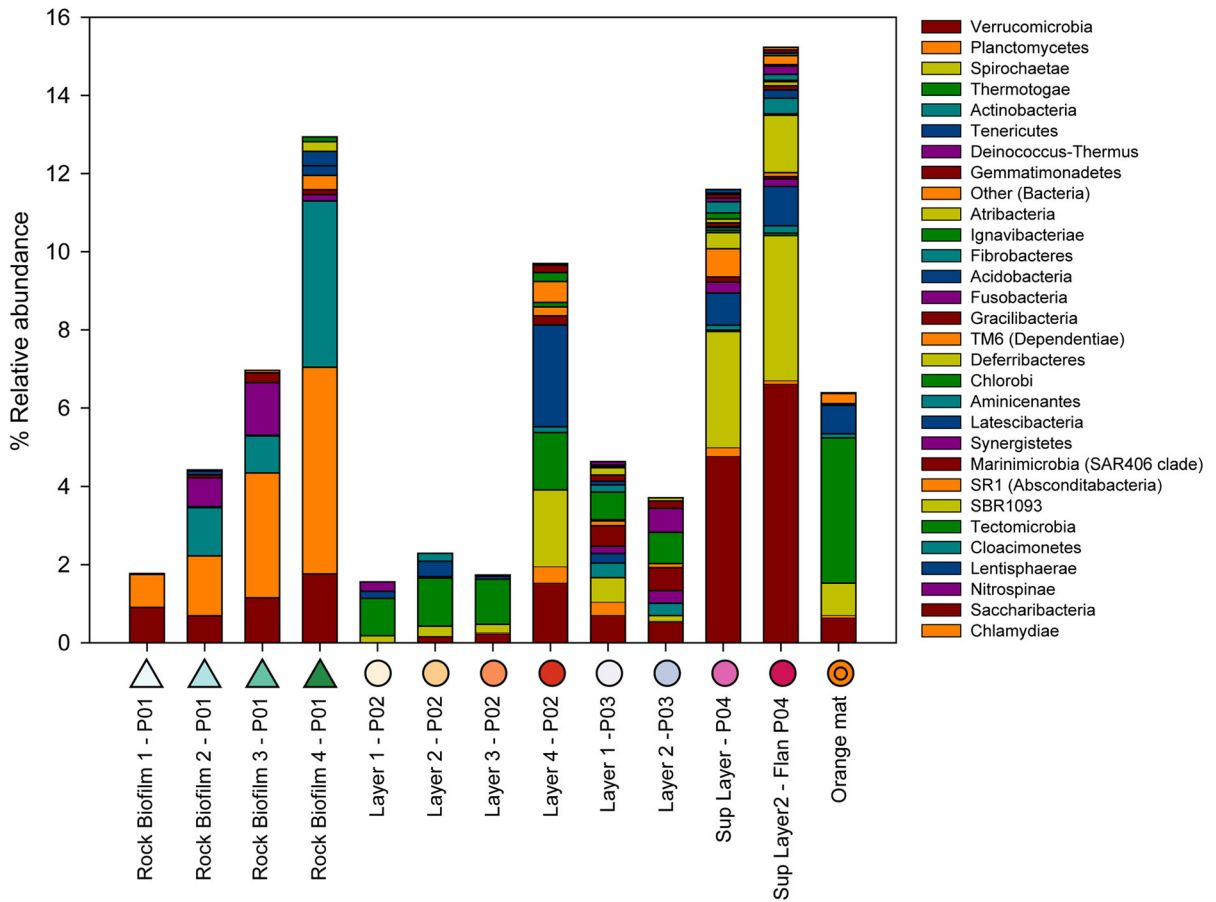


Figura 4 Filos bacterianos raros y semi-raros en diferentes sitios y muestras de Laguna Puilar, Salar de Atacama

Rhodobacteraceae y Chromatiaceae (tiohalocapsa).

Las muestras del sitio P04 corresponden a la capa superficial del tapete microbiano. Este sitio exhibió el mayor número de filos bacterianos (28) en Laguna Puilar (Fig.3), 20 de los cuales eran semi-raros o raros (Fig.4). Finalmente, analizamos una muestra aislada denominada 'mat naranja', detectando que el 33% de la abundancia relativa estaba relacionada con la familia Halanaerobiaceae (Firmicutes) y 12% al género *Ectotiorodospira* (Gammaproteobacteria).

Análisis de ácidos grasos

Se registraron un total de 49 FAME y BAME de los diferentes taxones productores y consumidores (Tabla S1). Los perfiles de ácidos grasos estuvieron dominados por los ácidos grasos saturados (contribución media = 42,3 %) y monoinsaturados (42,8 %), con una menor contribución de los ácidos grasos poliinsaturados (12,4 %). En promedio, el 34,3 % de todos los ácidos grasos registrados de productores (biofilm, macrófitos y algas, tapetes microbianos) y consumidores (anfípodos y caracoles) eran de origen microbiano. Ordenación PCoA (Fig. 5) reveló una variación considerable en los perfiles de ácidos grasos tanto dentro como entre diferentes tipos de muestras, con estera microbiana

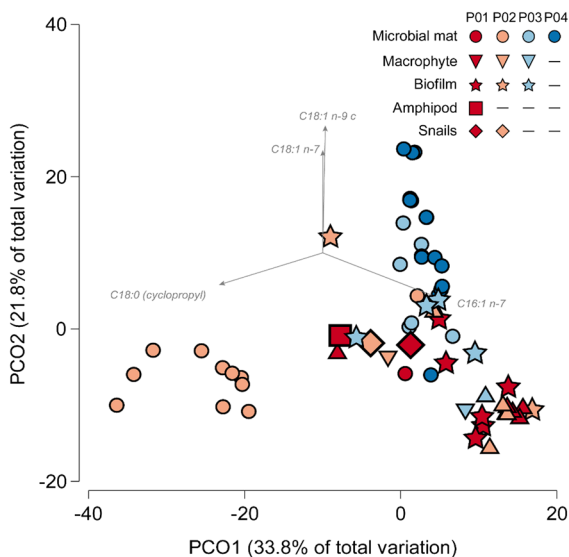


Figura 5 PCoA ordenación de datos de ácidos grasos registrados de una variedad de taxones de productores y consumidores recolectados en cuatro sitios en Laguna Puilar. Los vectores reflejan la dirección y la fuerza de múltiples correlaciones entre la contribución porcentual de los ácidos grasos individuales y los dos ejes canónicos.

siendo las muestras más distintas (especialmente de P02). Esta observación fue respaldada por análisis estadísticos que comparan los perfiles de ácidos grasos de los diferentes productores (PERMANOVA: Pseudo-F_{7,59}= 3,4, P = 0,0001). Los perfiles de ácidos grasos de la estera microbiana diferían entre los sitios (Pseudo-F_{3,34}= 9,6, P = 0,0001) e incluso entre las diferentes capas de un tapete muestreado de una ubicación (P02 capas 1–4: Pseudo-F_{3,10}= 3,8, P = 0,003). Las muestras de biopelícula tenían perfiles de ácidos grasos similares entre sitios (Pseudo-F_{2,8}= 1,08, P = 0,39).

Dadas las marcadas diferencias tanto en las comunidades microbianas como en los perfiles de ácidos grasos observados en las esteras microbianas, examinamos si había alguna asociación entre las dos medidas. La comparación de muestras de tapetes microbianos en ordenaciones de PCoA basadas en datos moleculares y de ácidos grasos muestra similitudes cercanas (ver patrones mostrados por marcadores circulares en las Figs.5,6), destacando los siguientes seis filos: el Bacteroidetes, cianobacterias, firmicutes, proteobacterias, tenericutesy Verrucomicrobia. Por lo tanto, es posible que la distribución y disponibilidad de ácidos grasos particulares en el Salar esté impulsada por la presencia y actividad de diferentes grupos microbianos. Los ácidos grasos bacterianos hicieron una gran contribución a nuestra muestra de anfípodos (47,8% del total de ácidos grasos), mientras que

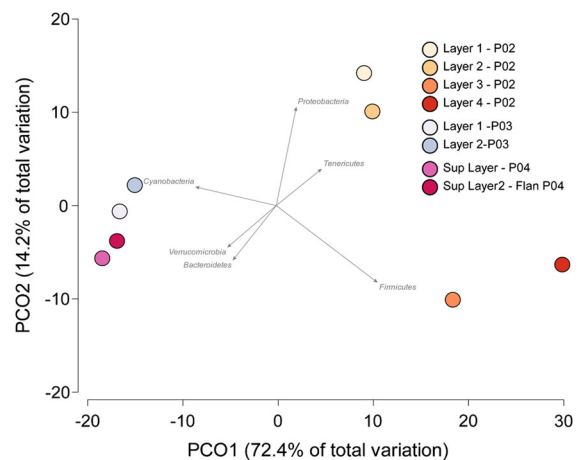


Figura 6 Ordenación de PCoA que muestra la variación en los perfiles de ácidos grasos de la estera microbiana (basada en valores medios donde se tomó más de una muestra por sitio/capa). Los vectores muestran la fuerza y la dirección de las correlaciones entre la abundancia relativa de diferentes filos microbianos y los dos ejes canónicos que se muestran, lo que indica la probable influencia bacteriana en los perfiles de ácidos grasos. Tenga en cuenta la similitud general entre esta ordenación y el patrón que muestran las muestras de esteras microbianas en la Fig.2

contribución a los gasterópodos varió entre 22 y 27% (Tabla S1).

Análisis de isótopos estables

Dado que el área de prospección era relativamente pequeña, la variación isotópica fue considerable tanto en términos del rango de $\delta^{15}\text{N}$ (-0,3 a 13,1%) y $\delta^{13}\text{C}$ (-26,4 a -1,2‰) mostrados por los diferentes taxones examinados (Fig.7). Las diferentes fuentes de producción primaria eran isotópicamente distintas (PERMANOVA $\delta^{15}\text{N}$ NORTE- $\delta^{13}\text{C}$: Pseudo- $F_{2,53} = 22,14$, $P = 0,0001$). Ambos tapetes microbianos (Pseudo- $F_{3,27} = 345,6$, $P = 0,0001$) y macrófitos (Pseudo- $F_{2,11} = 101,6$, $P = 0,0001$) varió isotópicamente por sitio. El biofilm también varió, pero en menor grado (Fig.7a: biopelícula: Pseudo- $F_{2,15} = 3,43$, $P = 0,05$).

Los tres taxones de consumo examinados aquí eran isotópicamente distintos (Pseudo- $F_{2,55} = 54,89$, $P = 0,0001$) con caracoles y anfípodos siendo ^{13}C y ^{15}N empobrecido en relación con los flamencos. Ambos anfípodos (Pseudo- $F_{2,26} = 3,74$, $P = 0,007$) y caracoles (Pseudo- $F_{1,6} = 21,16$, $P = 0,028$) difirió isotópicamente entre sitios con individuos de P01 agotados en ^{13}C pero enriquecido en ^{15}N relativo a los individuos de P02. Los anfípodos no mostraron ninguna

patrón consistente en términos de su posición para los productores en los tres sitios donde fueron encontrados (P01-3). Se superpusieron con macrófitos en P01, pero se enriquecieron en ambos ^{13}C y ^{15}N en relación con los macrófitos en P02 y P03, y superpuesto con tapetes microbianos en ambos sitios. Los caracoles en P01 se superpusieron con macrófitos, pero los caracoles en P02 obviamente no estaban vinculados a ninguna fuente de energía en P02. Las plumas de los flamencos eran extremadamente variables en términos de ambos $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, y eran típicamente ^{13}C y ^{15}N enriquecido en relación con el productor u otros taxones consumidores.

Discusión

Los microorganismos fueron considerados durante mucho tiempo como una 'caja negra' con respecto a su papel ecológico en los ambientes acuáticos. Su papel funcional, frecuentemente asociado con el procesamiento de materia orgánica, ha sido ampliamente subestimado.

Los avances recientes en las técnicas de secuenciación del ADN han permitido una mayor comprensión del papel funcional, la diversidad y la distribución de las comunidades microbianas en diferentes ecosistemas. Los ecosistemas acuáticos del Salar de Atacama son ambientes únicos,

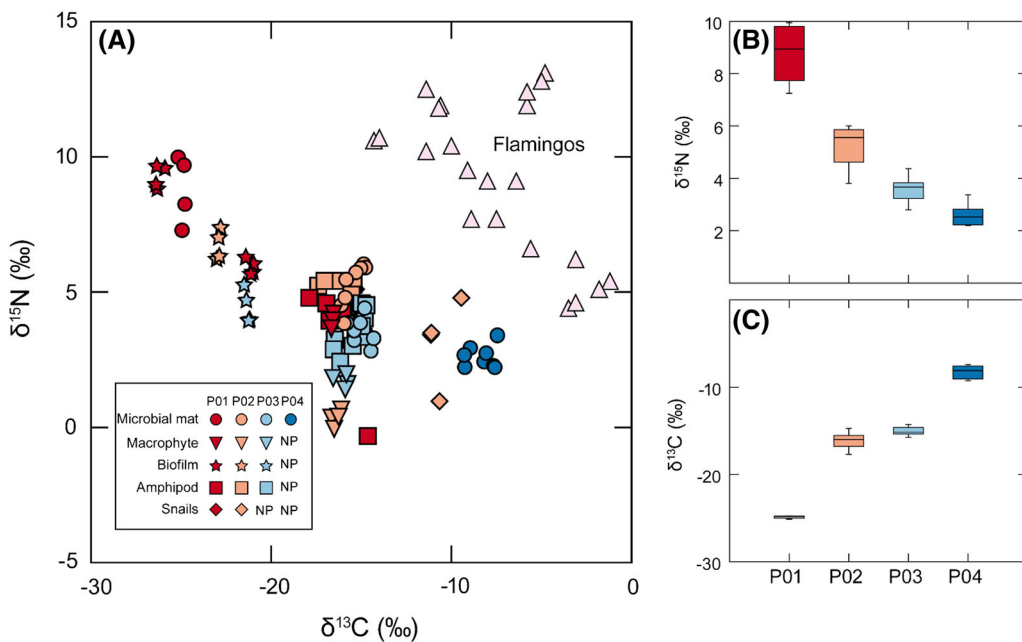


Figura 7 Los valores de isótopos estables variaron considerablemente (a) entre las diferentes fuentes putativas de producción (biofilm, macrófitos y tapetes microbianos), y taxones de consumo. La espacial

la variación también fue extremadamente marcada dentro de los diferentes productores [por ejemplo, tapetes microbianos (que se muestran en la imagen de Cristo)]

donde domina la vida microbiana. Los estudios de diversidad microbiana en el Salar de Atacama han revelado repetidamente un número importante de nuevos grupos de bacterias y arqueas (por ejemplo, Demergasso et al.2008; Dorador et al.2009; Thiel et al.2010), sin embargo, la descripción de nuevas cepas es poco frecuente.

Los lagos del Salar de Atacama son ecosistemas microbianos frágiles, cuya existencia depende directamente de la disponibilidad de agua. Por lo tanto, las prácticas actuales de extracción de agua y salmuera para actividades mineras representan amenazas importantes y apremiantes contra el mantenimiento de estos ecosistemas.

Más allá de la diversidad microbiana reportada a partir de esteras microbianas, es evidente que estas estructuras juegan un papel funcional clave en el sistema. Los perfiles de ácidos grasos revelaron una alta variabilidad espacial y una estrecha relación con taxones bacterianos clave. Por ejemplo, el perfil de ácidos grasos del tapete microbiano en el sitio P02 mostró una marcada diferenciación y una asociación específica con ciertos grupos. La capa 1 estaba relacionada con proteobacterias (ectotiorodospirayHalomonadaceae) y la capa 2 a diomarináceasyEctotiorodospira. A su vez, la capa 3 se relacionó con Firmicutes (Halanaerobium). ectotiorodospira Se ha demostrado que las especies muestran respuestas a los cambios en la salinidad y la temperatura, y los cambios de temperatura tienen un efecto marcado en su composición de ácidos grasos (Imhoff y Thiemann1991).

Los análisis de ácidos grasos se centraron en las capas microbianas, ya que la comparabilidad entre muestras fue mayor para este tipo de muestra. De manera similar a los resultados de los análisis de isótopos estables, las alfombras microbianas de los cuatro subsitios muestreados con diferente salinidad diferían notablemente en sus biomarcadores de ácidos grasos. Curiosamente, el ácido palmitoleico ($C_{16:1n-7}$) se asoció más fuertemente con el subsitio P01 menos salino cerca de la entrada de agua dulce al Salar. Esto sugiere que las diatomeas (para las cuales el ácido palmitoleico es un ácido graso biomarcador de uso común, véase, por ejemplo, Dalsgaard et al.2003) dominaron en la parte de agua dulce, mientras que fueron suprimidos por las crecientes salinidades. En los sitios más salinos, C monoinsaturado₁₈ ácidos grasos como el oleico ($C_{18:1n-9}$) y ácido vaccénico ($C_{18:1n-7}$), que muy probablemente estén asociados con procariotas fototróficas como las cianobacterias (Dalsgaard et al. 2003). El uso de biomarcadores de ácidos grasos agrega una nueva dimensión a la imagen de la red alimentaria del Salar de Atacama; este es el primero de un Salar de gran altura. Como la composición de ácidos grasos de

los consumidores normalmente refleja que de su dieta, los biomarcadores de ácidos grasos son una herramienta útil para obtener información más amplia que la que se obtiene solo de los isótopos estables. Por lo tanto, se suman a una comprensión más profunda de la estructura trófica, en particular cuando se combinan biomarcadores de ácidos grasos e isótopos estables.

Con respecto al papel putativo de los taxones microbianos como fuente de energía y nutrientes para los consumidores de invertebrados y vertebrados en el Salar, nuestros datos iniciales indican que tanto los anfípodos como los gasterópodos probablemente dependen en gran medida (20–50 %) de los ácidos grasos derivados de bacterias en el Salar. Los datos de isótopos estables fueron menos claros, lo que refleja la gran cantidad de variación isotópica aparente dentro del gradiente de salinidad muy corto (Fig.7). Los datos de isótopos estables mostraron que en el sitio con los tapetes microbianos más extensos (P02), los anfípodos y los gasterópodos se parecían mucho a los valores de tapetes microbianos pero divergieron de los tapetes microbianos en P01 y P02.

La variación isotópica aparente en las muestras de plumas de flamencos es de una escala similar a la que se observa en los tapetes microbianos y otras fuentes potenciales de C y N. Esto se puede atribuir en parte al hecho de que las plumas provienen de tres especies diferentes de flamencos, con diferentes estructuras de edad, preferencias e historias de alimentación, así como distribuciones geográficas. Sin embargo, si las plumas de flamenco se corrigen por el fraccionamiento trófico [media (\pm SD) factores de discriminación trófica = $d_{13}3.6\pm0.6$; d_{15} norte 5.6 ± 0.3] (Mizutani et al.1992), sugiere que están consumiendo componentes microbianos en los sedimentos.

Hasta el momento, nuestros datos demuestran una notable variabilidad en todos los parámetros medidos (salinidad, isótopos estables, ácidos grasos, composición de la comunidad microbiana). Esto se aplica a las muestras de los presuntos productores y consumidores primarios, así como a los descomponedores a lo largo de un gradiente de salinidad de pequeña escala pero pronunciado. Nuestros resultados sugieren que los procesos basales que subyacen a las funciones del ecosistema del Salar son probablemente complejos y muy variables en el espacio y el tiempo. Esto destaca que los Salares son ecosistemas mucho más complejos de lo que se pensaba y que se requieren estudios más detallados para comprender su biología. El trabajo futuro de nuestro grupo hará uso del análisis de isótopos estables específicos de compuestos de ácidos grasos y aminoácidos para identificar el origen de estos compuestos y su importancia para los consumidores (Evershed et al.2007; Larsen et al.2009; middelburg2014).

Agradecimientos Nos gustaría agradecer a la Beca colaborativa BMBF-CONICYT N-PCCI1-2043 (BMBF FKZ 01DN13015) y Fondecyt 1140179. También agradecemos profundamente a CONAF y al Sr. Nelson Amado por el apoyo de muestreo en Laguna Puilar. Agradecemos a Vilma Barrera e Irma Vila por los análisis químicos ya Katja Preuss y Daniel Schäfer por su ayuda con los análisis de ácidos grasos. Chris Harrod cuenta con el apoyo de Núcleo Milenio INVASAL financiado por el programa del gobierno de Chile, Iniciativa Científica Milenio del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.

Referencias

- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multi-análisis de varianza variable. *Austral Ecol* 26:32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
- Anderson MJ, Gorley RN, Clarke KR (2008) PERMANOVA? para PRIMER: guía de software y métodos estadísticos. PRIMER-R, Plymouth
- Campos V (1997) Microorganismos de ambientes extremos: Salar de Atacama, Chile. En: Charrier R, Aceituno P, Castro M, Llanos A, Raggi LA (eds) El Altiplano: ciencia y conciencia de los Andes. Actas del segundo Simposio internacional de Estudios Altiplánicos, Santiago, pp 143–147
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J et al (2010) QIIME permite el análisis de datos de secuenciación comunitaria de alto rendimiento. *Métodos nacionales* 7: 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Dalsgaard J, St John M, Kattner G et al (2003) Ácido graso trófico marcadores en el ambiente marino pelágico. *Adv Mar Biol* 46:225–340
- Demergasso C, Casamayor EO, Chong G et al (2004) Distribución de la diversidad genética procariótica en lagos atalashalinos del desierto de Atacama, norte de Chile. *FEMS Microbiol Ecol* 48:57–69. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.013>
- Demergasso C, Escudero L, Casamayor EO et al (2008) Novedad y heterogeneidad espacio-temporal en la diversidad bacteriana del lago hipersalino Tebenquiche (Salar de Atacama). *Extremófilos* 12:491–504. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0153-y>
- Dirección General de Aguas, DGA (1991) Catastro General de usuarios de aguas de los cauces afluentes al Salar de Atacama. Informe final. Tomó 1 - 4
- Dorador C, Meneses D, Urtuvia V et al (2009) Diversidad de Bacteroidetes en cuencas evaporíticas salinas de altura en el norte de Chile. *J Geophys Res* 114:G00D05. <https://doi.org/10.1029/2008JG000837>
- Dorador C, Vila I, Remonsellez F et al (2010) Clusters únicos para Archaea en Salar de Huasco, una cuenca evaporítica atalashalina del Altiplano chileno. *FEMS Microbiol Ecol* 7:1291–302. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00891.x>
- Evershed RP, Bull ID, Corr LT et al (2007) Compuesto específico análisis de isótopos estables en ecología y paleoecología. En: Michener RH, Lajtha K (eds) Isótopos estables en ecología y ciencia ambiental, II ed. Blackwell, Oxford, págs. 480–540
- Farias ME, Rasuk MC, Gallagher KL et al (2017) Procariota diversidad y características biogeoquímicas de los ecosistemas microbianos bentónicos en La Brava, un lago hipersalino en el Salar de Atacama, Chile. *PLoS ONE* 12(11):e0186867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186867>
- Fariás ME, Contreras M, Rasuk MC et al (2014) Caracterización de la diversidad bacteriana asociada a tapetes microbianos, evaporitas de yeso y microbianas carbonatadas en humedales talásicos: Tebenquiche y La Brava, Salar de Atacama, Chile. *Extremófilos* 18:311–329. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0617-6>
- Fernandez AB, Rasuk MC, Visscher PT et al (2016) Microbiano diversidad en ecosistemas sedimentarios (domos de evaporitas, tapetes microbianos y costras) de la laguna hipersalina Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Frente Microbiol* 7:1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01284>
- Ghomi MR, Von Elert E, Borchering J et al (2014) Ácido graso composición y contenido de gobio redondo (*Neogobius melanostomus* Pallas 1814) y mono gobio (*Neogobius fluviatilis* Pallas 1814), dos especies de góbidos invasoras en el bajo río Rin (Alemania). *J Appl Ichthyol* 30(3):527–531. <https://doi.org/10.1111/jai.12312>
- Happel A, Czesny S, Rinchar J et al (2017) Pretratamiento de datos y la elección de la métrica de semejanza afectan la forma en que los perfiles de ácidos grasos representan los orígenes dietéticos conocidos. *Ecol Res* 32:757–767. <https://doi.org/10.1007/s11284-017-1485-9>
- Imhoff JF, Thiemann B (1991) Influencia de la concentración de sal y la temperatura en la composición de ácidos grasos de *ectotiorodospiray* otras bacterias púrpuras fototróficas halófilas. *Arch Microbiol* 156:370–375. <https://doi.org/10.1007/BF00248713>
- Kelley C, Nicholson BE, Beaudoin CS et al (2014) Trimethylas adiciones de láminas y materia orgánica revierten los efectos de limitación del sustrato sobre el $\delta^{13}C$ Valores de C del metano producido en tapetes microbianos hipersalinos. *Appl Environ Microbiol* 80(23):7316–7323. <https://doi.org/10.1128/AEM.02641-14>
- King G (2015) El monóxido de carbono como fuente de energía metabólica para microbios extremadamente halófilas: implicaciones para la actividad microbiana en el regolito de Marte. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(14):4465–4470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424989112>
- Larsen T, Taylor DL, Leigh MB et al (2009) Isótopo estable huella dactilar: un método novedoso para identificar el origen vegetal, fúngico o bacteriano de los aminoácidos. *Ecología* 90:3526–3535. <https://doi.org/10.1890/08-1695.1>
- Lizama C, Monteoliva-Sánchez M, Suárez-García A et al (2002) *Halorubrum tebenquichense* sp. nov., una nueva arquea halófila aislada de las Salinas de Atacama, Chile. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:149–155. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-149>
- Mardones L (1997) Flux et evolution des solutions salines dans les systemes hidrologiques des salars d'Ascotan et d'Atacama. Estos de Doctorado en Ciencias de la Terre, Université et Paris
- McCutchan JH, Lewis WM, Kendall C et al (2003) Variación en cambio trófico para proporciones de isótopos estables de carbono, nitrógeno y azufre. *Oikos* 102:378–390. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12098.x>
- McDuff S, King GM, Neupane S et al (2016) Aislamiento y caracterización de CO-oxidantes extremadamente halófilas

- Euryarchaeota de cenizas hipersalinas, sedimentos y suelos y descripción de un nuevo oxidante de CO₂, *Haloferax namakaokahaiae* Mke2.3T, sp. nov. *FEMS Microbiol Ecol* 92(4):fiw028. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw028> Middelburg JJ (2014) Los isótopos estables diseccionan las redes alimentarias acuáticas de arriba hacia abajo. *Biogeociencias* 11:2357–2371. <https://doi.org/10.5194/bg-11-2357-2014>
- Mizutani H, Fukuda M, Kabaya Y (1992) ¹³C y ¹⁵N enriquece- factores de desarrollo de las plumas de 11 especies de aves adultas. *Ecología* 73: 1391–1395. <https://doi.org/10.2307/1940684>
- Ortiz C, Aravena R, Briones E et al (2013) Fuentes de superficie agua para el ecosistema de Soncor, cuenca del Salar de Atacama, norte de Chile. *Hydrolog Sci J* 59:336–350. <https://doi.org/10.1080/02626667.2013.829231>
- Paliy O, Shankar V (2016) Aplicación de estadísticas multivariadas Técnicas en ecología microbiana. *Mol Ecol* 25:1032–1057. <https://doi.org/10.1111/mec.13536>
- Pedros-Alió C (2012) La rara biosfera bacteriana. *ana rev Mar Sci* 4:449–466. <https://doi.org/10.1146/annurevmarine-120710-100948>
- Peterson BJ, Fry B (1987) Isótopos estables en estudios de ecosistemas. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 293–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001453>
- Prado B, Lizama C, Aguilera M et al (2006) *Cromohalobacter nigrandesensissp. nov.*, una bacteria gramnegativa moderadamente halófila aislada del lago Tebenquiche en las salinas de Atacama, Chile. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:647–651. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63983-0>
- Quillaguamán J, Delgado O, Mattiasson B et al (2004) *Cromohalobacter sarencensissp. nov.*, un halófilo moderado psicotolerante aislado de la región salina andina de Bolivia. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1921–1926. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63153-0>
- Rasuk MC, Fernández AB, Kurth D et al (2016) Bacteriana diversidad en tapetes microbianos y sedimentos del desierto de Atacama. *Microbio Ecol* 71:44–56. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0649-9>
- Risacher F, Alonso H (1996) Geoquímica del Salar de Atacama, parte 2: evolución de las aguas. *Rev. Geol Chile* 23(2):123–134. <https://doi.org/10.5027/andgeoV23n2-a02>
- Risacher F, Alonso H, Salazar C (1999) Geoquímica de Aguas en Cuenas Cerradas: I, II y III Regiones - Chile. Volumen III: Estudio de Cuenas de la II Región. Convenio de Cooperación DGA – UCN – IRD (SIT N851) Thiel V, Tank M, Neuling SC et al (2010) Comunicación única nidades de bacterias fototróficas anoxigénicas en lagos salinos del Salar de Atacama (Chile): evidencia de un nuevo linaje filogenético de bacterias fototróficas gammaproteobacteriade pufL. Análisis de genes. *FEMS Microbiol Ecol* 74:510–522. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00966.x>
- Zúñiga LR, Campos V, Pinochet H et al (1991) A limnological reconocimiento del lago Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Hidrobiología* 210: 19–24. <https://doi.org/10.1007/BF00014320>