

**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE
DEPOSITACIÓN DE YESO DEL SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018



ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL SALAR DE LLAMARA

**Centro de Biotecnología
Universidad Católica del Norte**

INFORME DE AVANCE 3, MAYO 2018

Dra. Cecilia Demergasso

Dra. Lorena Escudero

Dr. Alex Echeverría

Índice de Contenido

Índice de Tablas	3
Índice de figuras	3
1. Antecedentes generales	4
2. Equipo de trabajo.....	4
Dra. Cecilia Demergasso	4
Dra. Lorena Escudero.....	4
Dr Alex Echeverría Vega	4
Ing. Roberto Veliz	4
3. Metodología.....	5
3.1 Análisis de metagenomas	5
4. Resultados.....	8
4.1 Composición de las comunidades.....	9
5. Conclusiones preliminares.....	10

Índice de Tablas

Tabla 1: Resumen de herramientas bioinformáticas utilizadas.....	7
---	---

Índice de figuras

Figura 1: Esquema general de trabajo con secuencias de metagenomas.	6
Figura 2: Análisis de similitud entre las muestras, basado en su taxonomía.	8
Figura 3: Análisis de similitud entre las muestras, basado en los genes presentes.	9

1. Antecedentes generales

De acuerdo a lo estipulado y solicitado por la Superintendencia de Medio ambiente a SQM, el Centro de Biotecnología de la Universidad Católica del Norte (CBAR) informa acerca de las actividades realizadas hasta el mes de mayo de 2018, en el marco del proyecto: “Estudio Metagenómico de Sistemas de Deposición de Yeso del Salar de Llamara”, en cumplimiento del contrato establecido entre la Universidad Católica del Norte (UCN) y SQM.

Este Informe de avance presenta la información correspondiente a los avances mensuales de la actividad de análisis de los metagenomas realizados a mayo del 2018.

2. Equipo de trabajo

El equipo de trabajo que participó en esta etapa del proyecto se describe a continuación:

Dra. Cecilia Demergasso

Cargo: Directora Centro de Biotecnología-Universidad Católica del Norte (CBAR)

Rol en el proyecto: Dirección de Proyecto, revisión y aprobación de informe.

Dra. Lorena Escudero

Cargo: Sub-directora Geomicrobiología CBAR

Rol en el proyecto: Investigadora responsable, redacción y revisión de Informe, coordinación y dirección de trabajo, gestión administrativa.

Dr Alex Echeverría Vega

Cargo: Jefe de Proyectos CBAR

Rol en el proyecto: Investigador, redacción de informe, supervisión y ejecución del análisis bioinformático.

Ing. Roberto Veliz

Cargo: Ingeniero informático CBAR

Rol en el proyecto: Procesamiento informático de secuencias de metagenomas.

3. Metodología

3.1 Análisis de metagenomas

El ADN obtenido de cada uno de los estratos descritos previamente (12 muestras en total) se utilizó para secuenciar los metagenomas mediante Illumina Hi-Seq 250 bp, con Paired Ends. La etapa de secuenciación ya se encuentra finalizada y en este momento el estudio se encuentra en la etapa de análisis de las secuencias. En un paso inicial, se configuró, con el apoyo de expertos en informática, un sistema de clúster de computadores, para ser utilizados en el análisis bioinformático de los metagenomas. Se contrató además un servicio clúster virtual (Google Cloud Computer Engine) para acelerar los procesos con mayor requerimiento de RAM. Las secuencias fueron limpiadas, los adaptadores removidos y se generaron los archivos de trabajo en formato fastq.

El procedimiento de trabajo con los metagenomas se ilustra en la Figura 1 y las herramientas utilizadas se resumen en la Tabla 1.

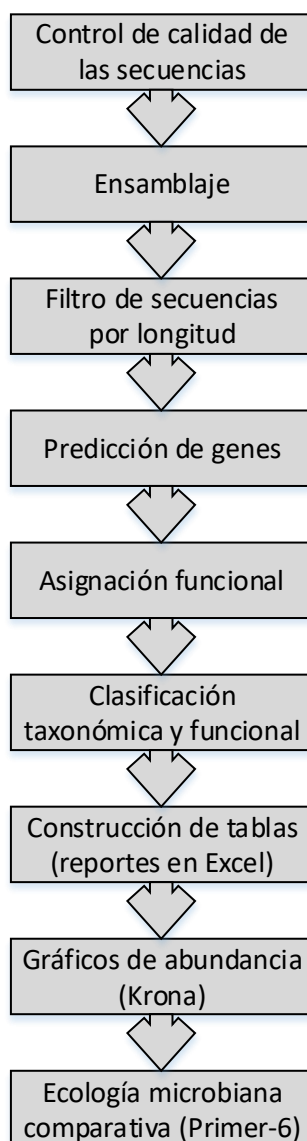


Figura 1: Esquema general de trabajo con secuencias de metagenomas.

Los pasos del procedimiento son:

1.- Control de calidad de secuencias. Se utilizó FasQC para visualizar el genoma y tener la idea inicial de la calidad de las secuencias. Mediante la herramienta Trimmomatic, se hizo la poda o corte de secuencias de mala calidad. Los parámetros utilizados fueron: Trimm left: 10 (prinseq). Trimm right: 10 (prinseq), Slidingwindow: 4:15 (Trimmomatic).

Min Len: 36 (Trimmomatic)

2.- Ensamblaje. Mediante el software SPades se realizó el ensamblaje *de novo* de las secuencias

- 3.- Filtros. Se eliminan las secuencias cuyo largo es inferior a 500 bp (Prinseq)
- 4.- Predicción de genes. Se utilizó PROdigal como herramienta para la predicción de genes.
- 5.- Asignación funcional. Para la asignación final de genes funcionales se utilizó DIAMOND con la base de datos de secuencias no redundantes, NCBI nr.
- 6.- Clasificación taxonómica y funcional. Se generaron árboles en base a la asignación taxonómica y funcional mediante el uso de MEGAN6, utilizando las bases de datos COG, SEED y asignación taxonómica del NCBI. Los datos obtenidos se utilizan para construir la base de datos.
7. Construcción de tablas: Consiste en la recopilación y ordenamiento de los datos de taxonomía y genes funcionales en planillas Excel con un tipo de ordenamiento que permita su traspaso a Krona y Primer-6.
8. Gráficos de abundancia: Se construyen en Excel, los gráficos Krona, que permiten examinar la taxonomía y asignación de genes en gráficos interactivos, ordenados por niveles jerárquicos en formato HTML.
9. El software Primer-6 permite realizar análisis comparativos, estadísticos y de diversidad tanto de la composición de la microbiota como de los genes funcionales encontrados.

Tabla 1: Resumen de herramientas bioinformáticas utilizadas.

SOFTWARE	Versión	Link de información	Descripción
Prinseq	0.20.4	https://sourceforge.net/projects/prinseq/	Permite cortar secuencias y adaptadores
Trimmomatic	0.36	http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic	Poda de secuencias
FastQC	0.11.7	https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/	Control de calidad
SPades	3.11.1	http://bioinf.spbau.ru/spades	Ensamblador
PRODIGAL	2.6	http://prodigal.ornl.gov/downloads.php	Predicción de genes
Diamond	0.9.9	https://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/diamond/	Asignación funcional (anotación funcional)
MEGAN 6	6	https://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan6	Taxonomía y funcionalidades
Krona	1	https://github.com/marbl/Krona/wiki	Gráficos interactivos
Primer	6	http://www.primer-e.com/primer6_updates.htm	Gráficos comparativos

A la fecha se continúa trabajando en la etapa de procesamiento de estas secuencias. Se ha concluido el procesamiento (Fig 1) de once de los doce puntos

de muestreo. La última muestra ¹P3E3 se encuentra en etapa de asignación funcional. Paralelamente se trabaja en la generación de los reportes.

4. Resultados

Se realizó un análisis completo de las muestras: P1E1, P1E2, P1E3, P1E4, P3E1, P3E2, P3E4, P4E1, P4E2, P4E3 y P4E4, faltando solo la muestra P3E3. La calidad de las secuencias de ADN obtenidas a partir de todas las muestras, cumple con los requerimientos para el análisis del metagenoma. El procedimiento de limpieza y preparación de las secuencias se realizó para cada una de las muestras según los pasos descritos anteriormente. Los resultados obtenidos están siendo procesados para determinar los genes presentes y las especies que componen las comunidades microbianas de los distintos estratos de cada uno de los tres puquios estudiados.

Se adjuntan como anexos, gráficos interactivos (Krona) que muestran genes y taxonomía en formato HTML. Los datos obtenidos hasta ahora han permitido avanzar en la construcción de la base de datos para realizar las comparaciones entre todas las muestras estudiadas. Preliminarmente se realizó una comparación entre las muestras mediante construcción de clusters. Se observa que existe una mayor similitud entre las muestras pertenecientes a un mismo puquio, excepto para el estrato 1 (E1), en que las muestras de todos los puquios tienden a ser similares tanto en su composición taxonómica (Fig. 2) como de los genes presentes (Fig. 3).

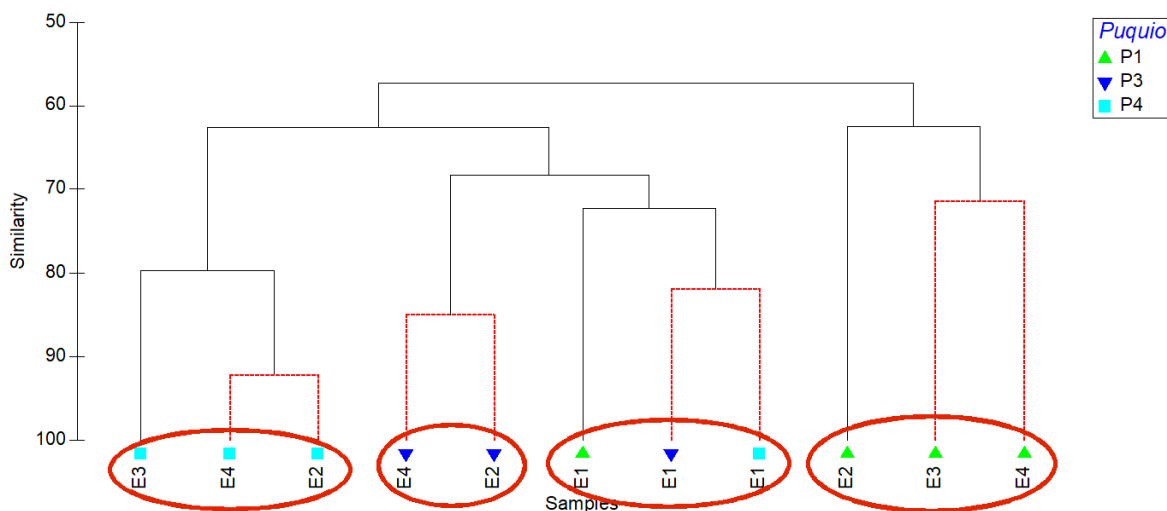


Figura 2: Análisis de similitud entre las muestras, basado en su taxonomía.

¹ Nomenclatura; P: Puquio, E: Estratos (verde E1, marrón post-verde E2, marrón claro E3, marrón oscuro E4)

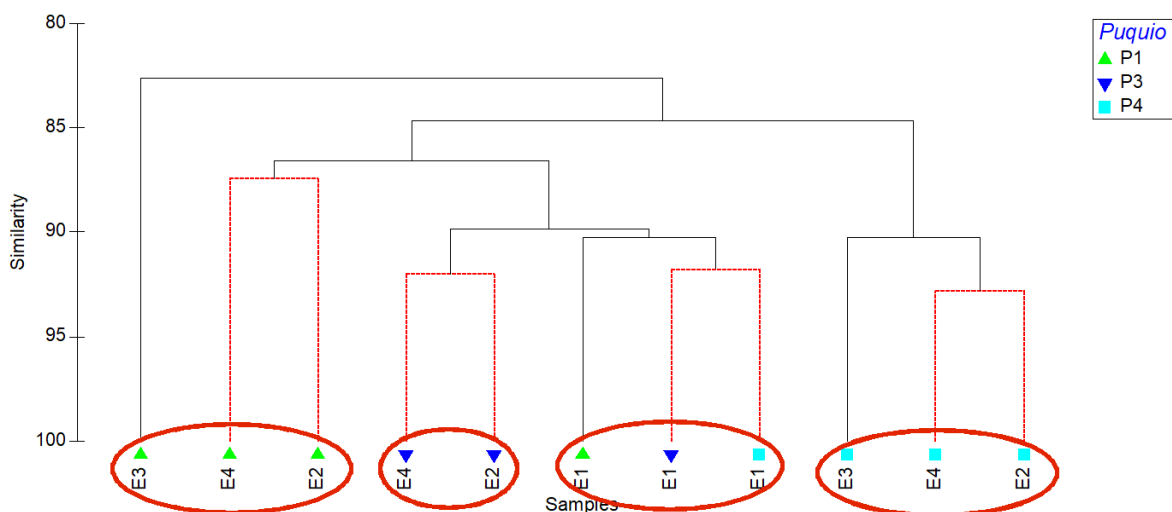


Figura 3: Análisis de similitud entre las muestras, basado en los genes presentes.

4.1 Composición de las comunidades

Se estudió la diversidad por asignación taxonómica y los genes presentes, dado el tamaño y tipo de imágenes, estas se presentarán separadamente. Los gráficos interactivos (formato HTML) de composición genómica se incluyen como Anexos 1 a 11 mientras los gráficos interactivos de taxonomía, se incluyen como Anexos 12 a 22.

Respecto a la composición de las comunidades microbianas, se observa que la mayor parte de las secuencias correspondería a microorganismos del tipo Proteobacteria. Los microorganismos del tipo Cyanobacterias se observan mayoritariamente en las muestras obtenidas a partir del primer estrato de todas las muestras (E1). En la próxima etapa, se finalizará el análisis de las secuencias de la última muestra y, luego, se realizará el análisis comparativo orientado a describir y comprender la distribución de la microbiota en el sitio de estudio.

5. Conclusiones preliminares

Se ha finalizado el análisis de 11 de las 12 muestras y en la próxima semana se completará el de la muestra faltante.

Aun no es posible determinar con exactitud los niveles de similitud y la agrupación de las muestras, dado que no se ha completado la base de datos. Sin embargo, en el análisis preliminar se ha observado que, respecto a la taxonomía, la similitud de las muestras supera el 65%, mientras a nivel genético, la similitud supera el 80%. Por otro lado, tenemos ya una visualización preliminar de la similitud que ocurre entre los distintos estratos de los puquios analizados.

**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 1

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018



Krona

Max depth

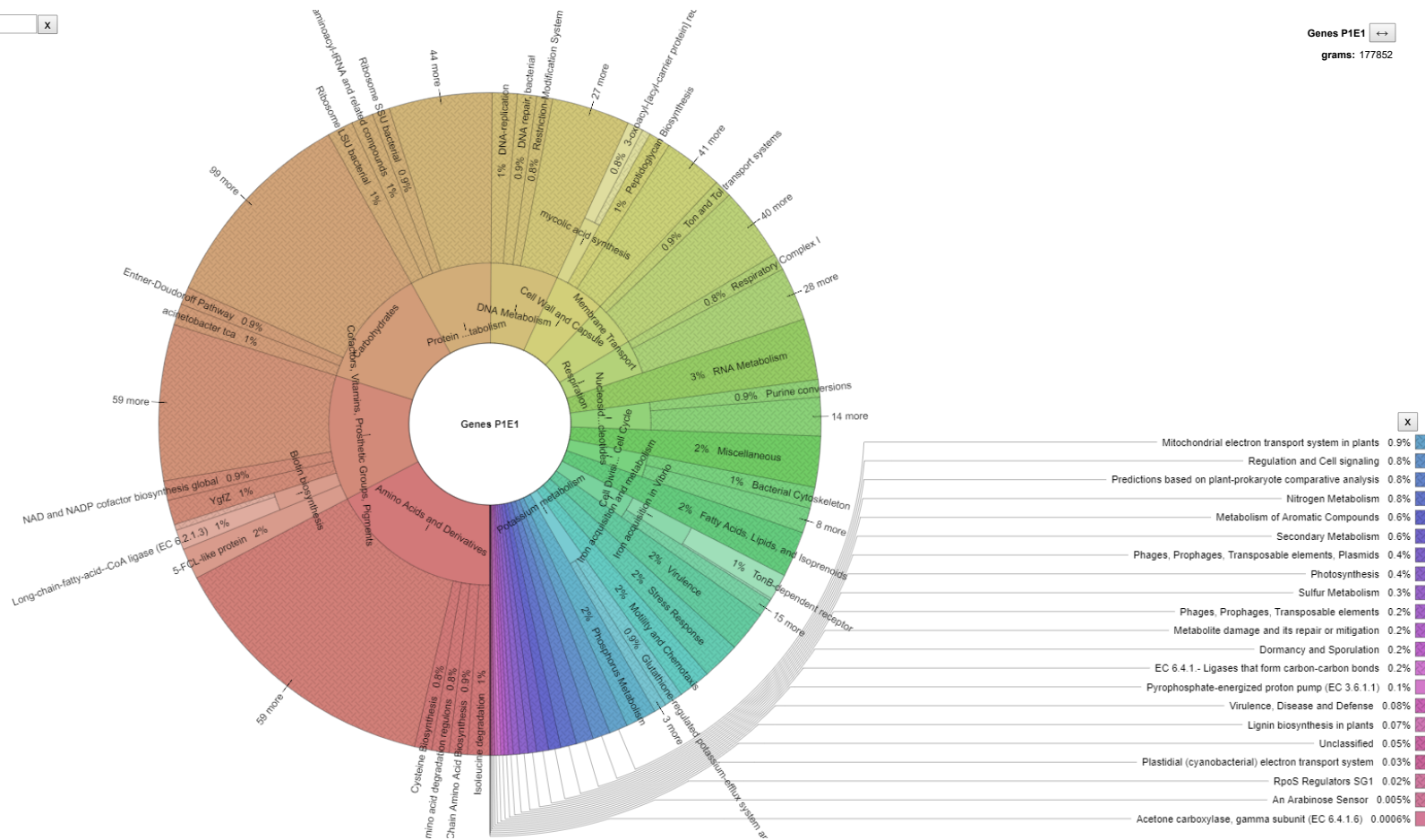
Font size

Chart size

Collapse

Genes P1E1

grams: 177852



**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 2

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018

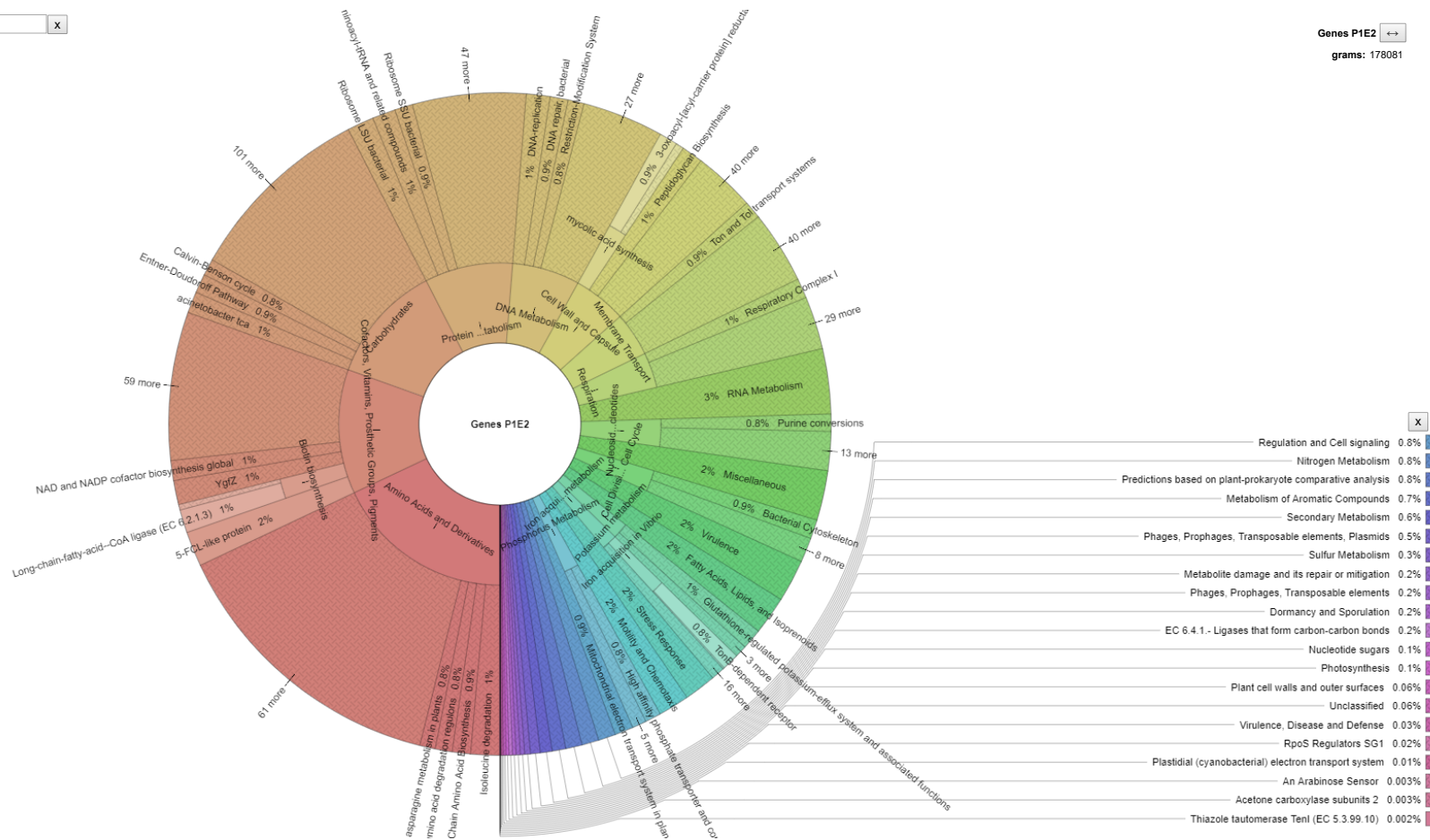


Krona

Max depth
 Font size
 Chart size
 Collapse

Genes P1E2

grams: 17801



**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 3

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018



Krona

Max depth

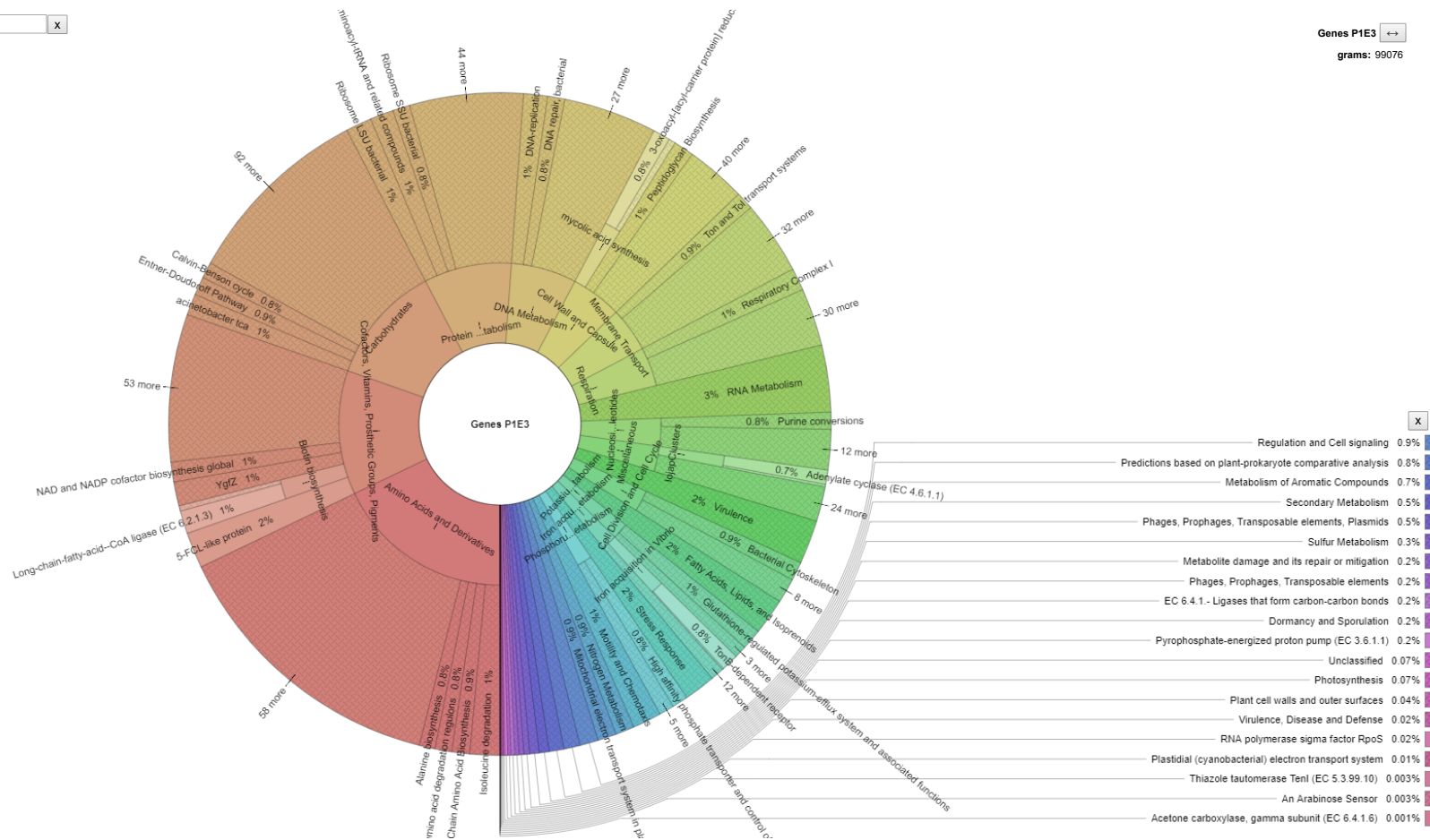
Font size

Chart size

Collapse

Genes P1E3

grams: 99076



**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 4

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018



Krona

Max depth

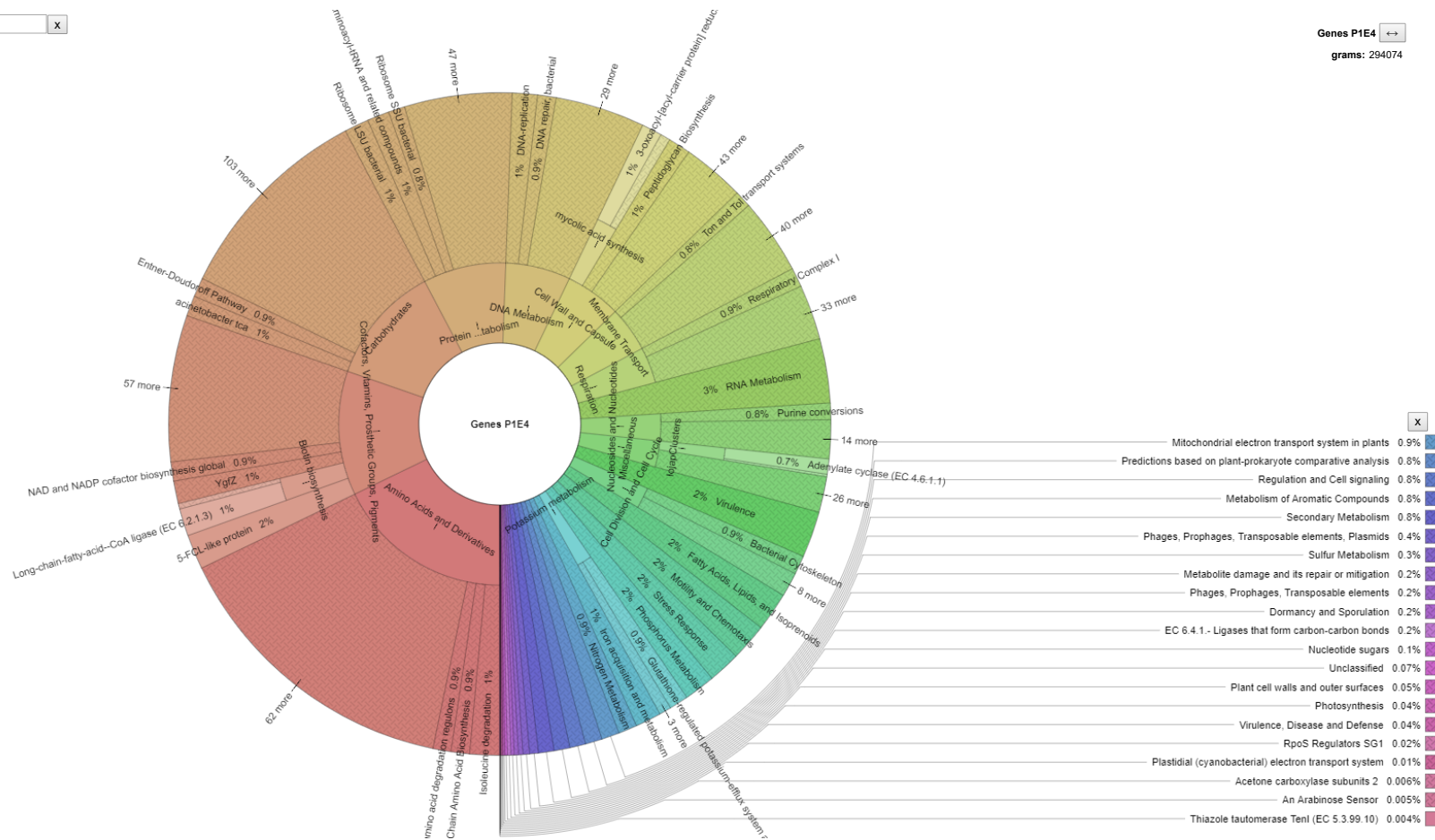
Font size

Chart size

Collapse

Genes P1E4

grams: 294074



**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 5

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018

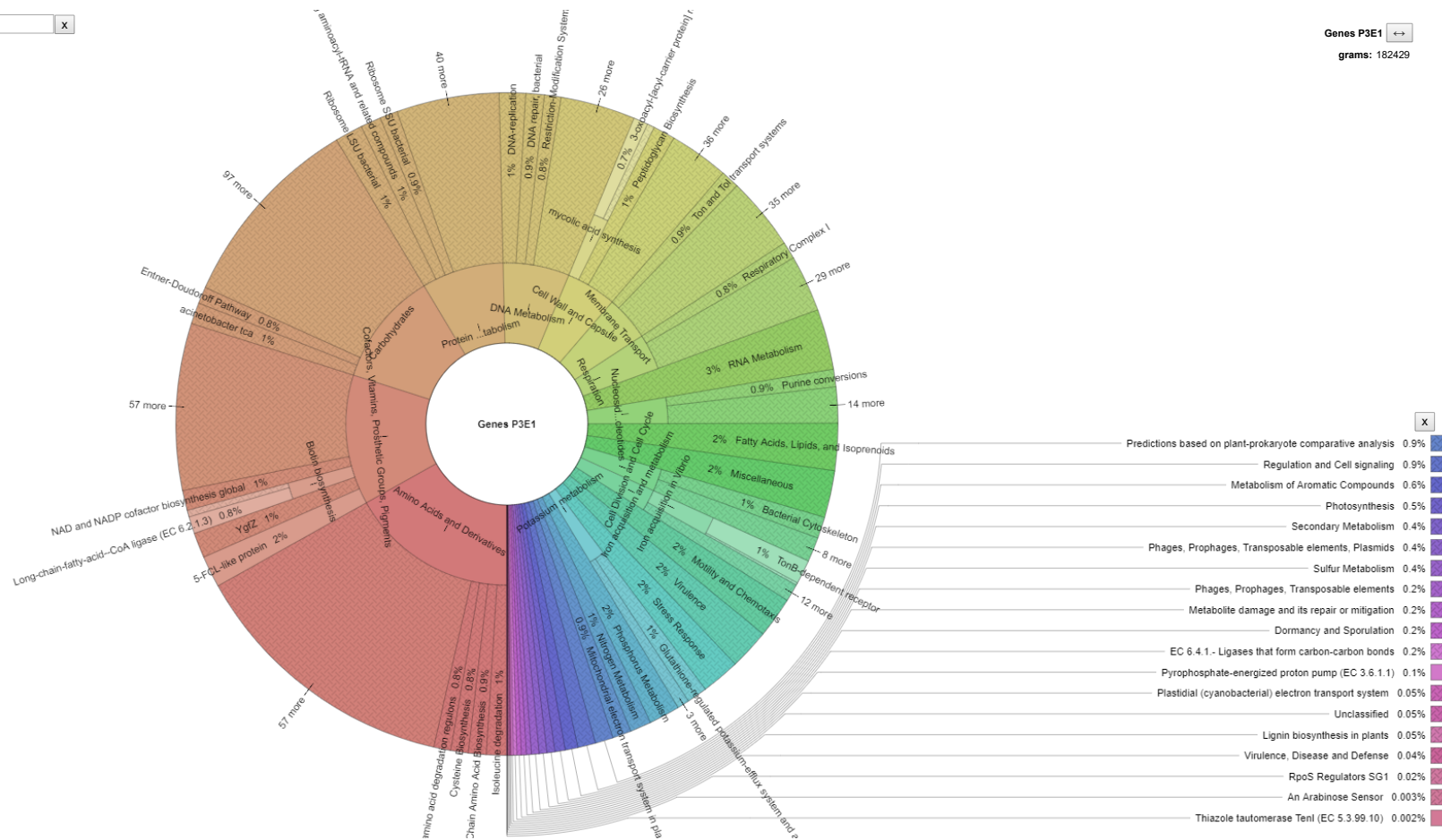


Krona

Max depth
 Font size
 Chart size
 Collapse

Genes P3E1

grams: 182429



**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 6

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018



Krona

Max depth

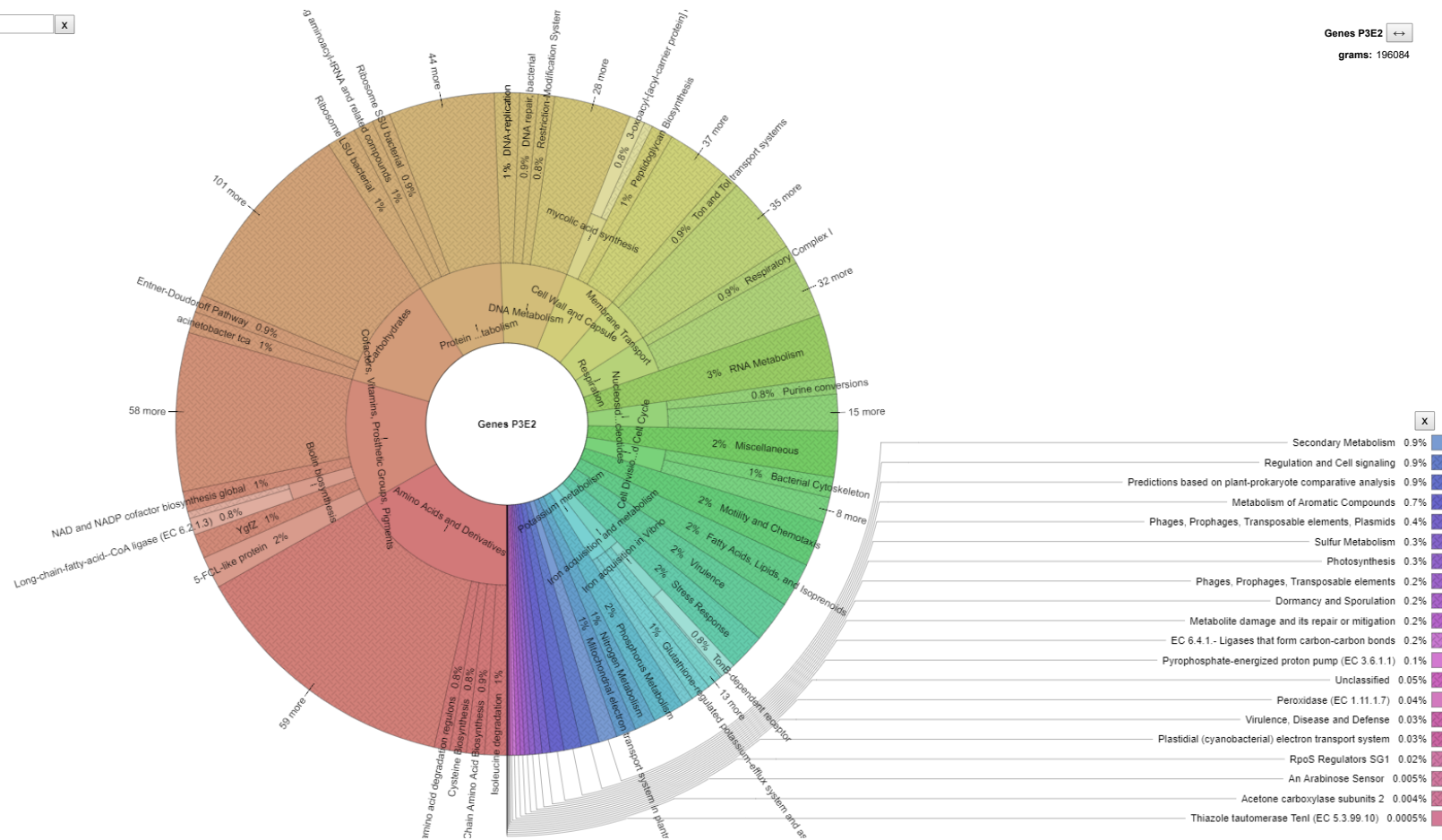
Font size

Chart size

Collapse

Genes P3E2

grams: 196084



**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 7

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018

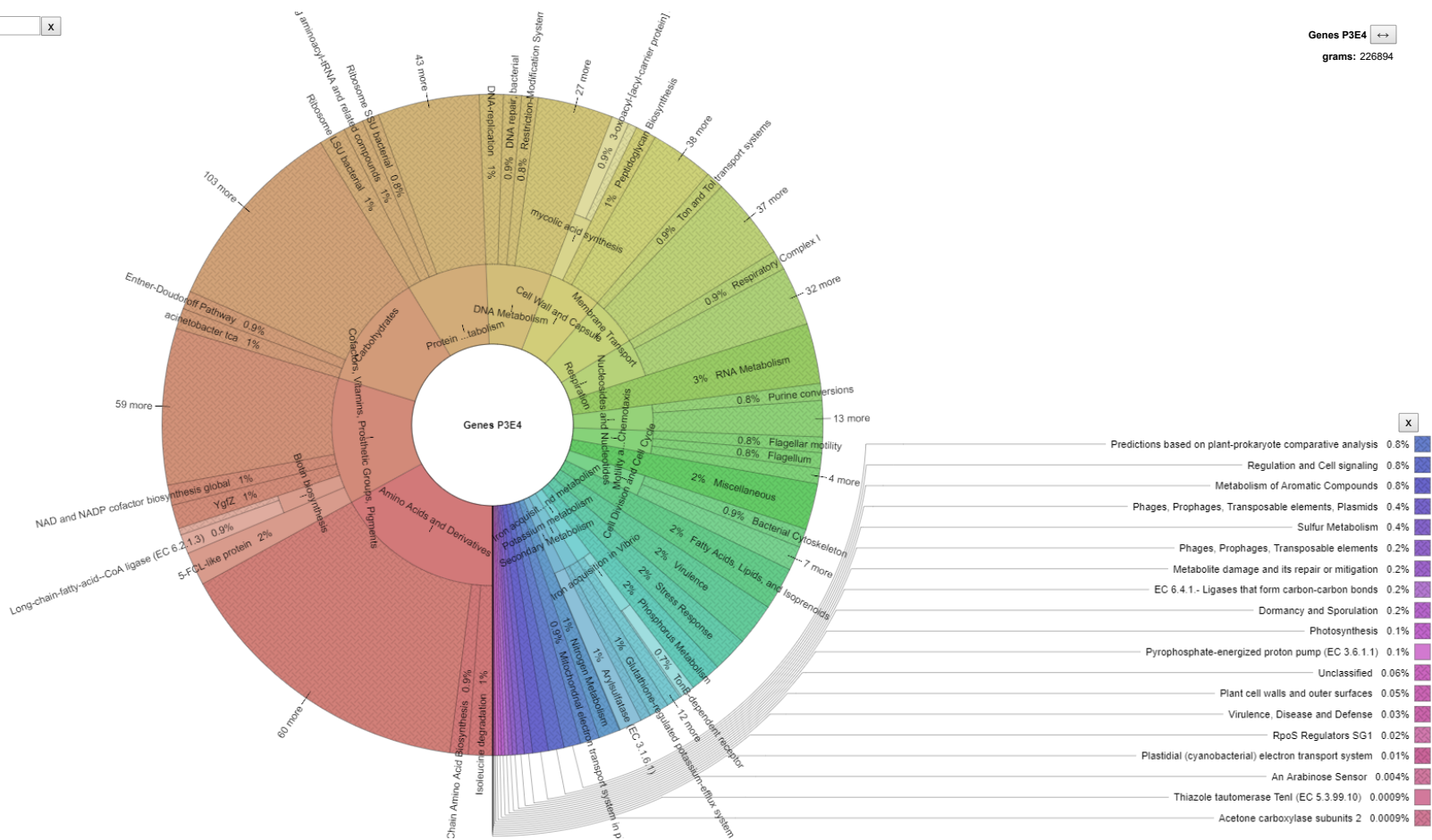


Krona

Max depth
 Font size
 Chart size
 Collapse

Genes P3E4

grams: 226894



**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 8

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018



Krona

Max depth

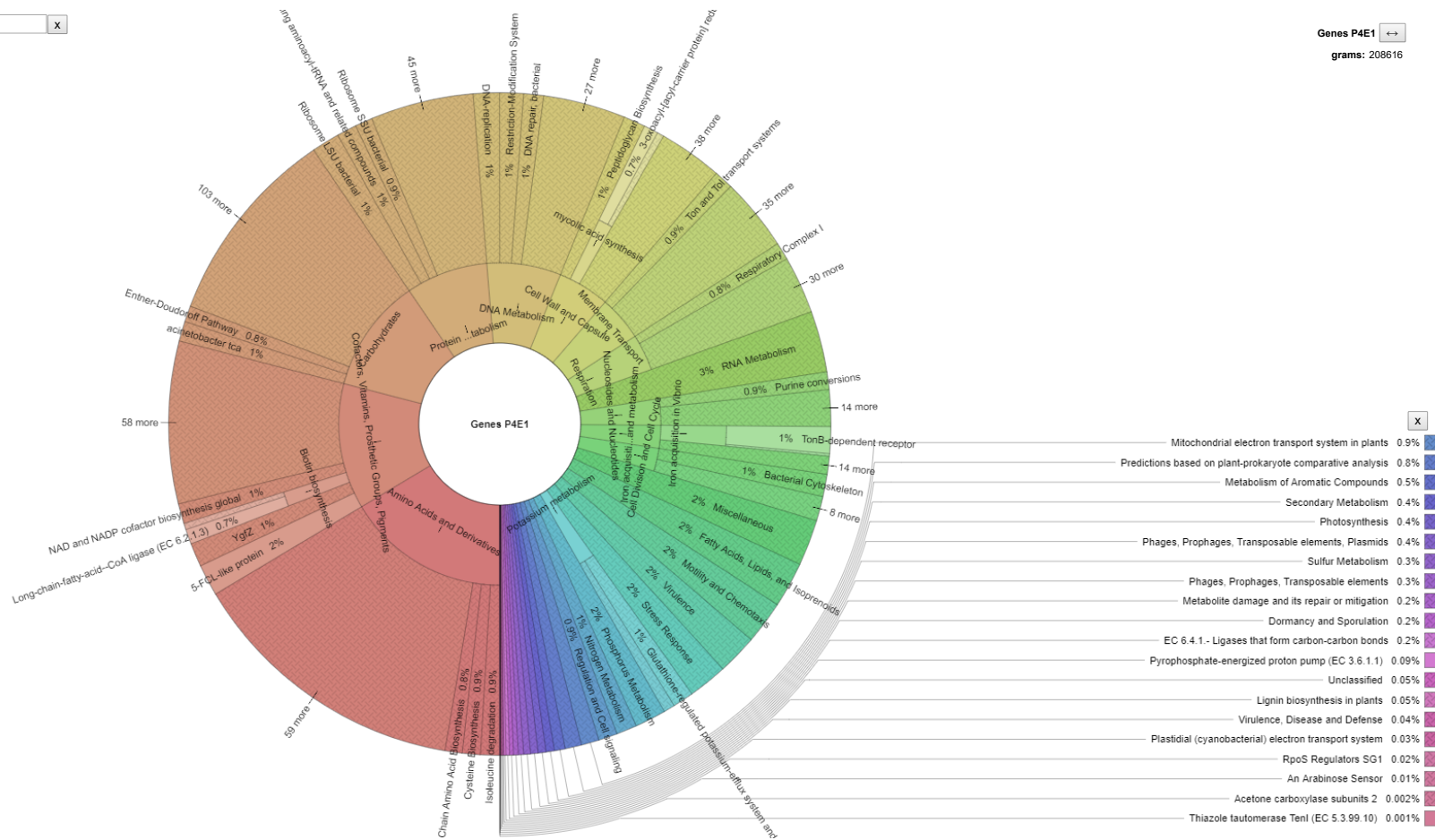
Font size

Chart size

Collapse

Genes P4E1

grams: 208616



**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 9

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018

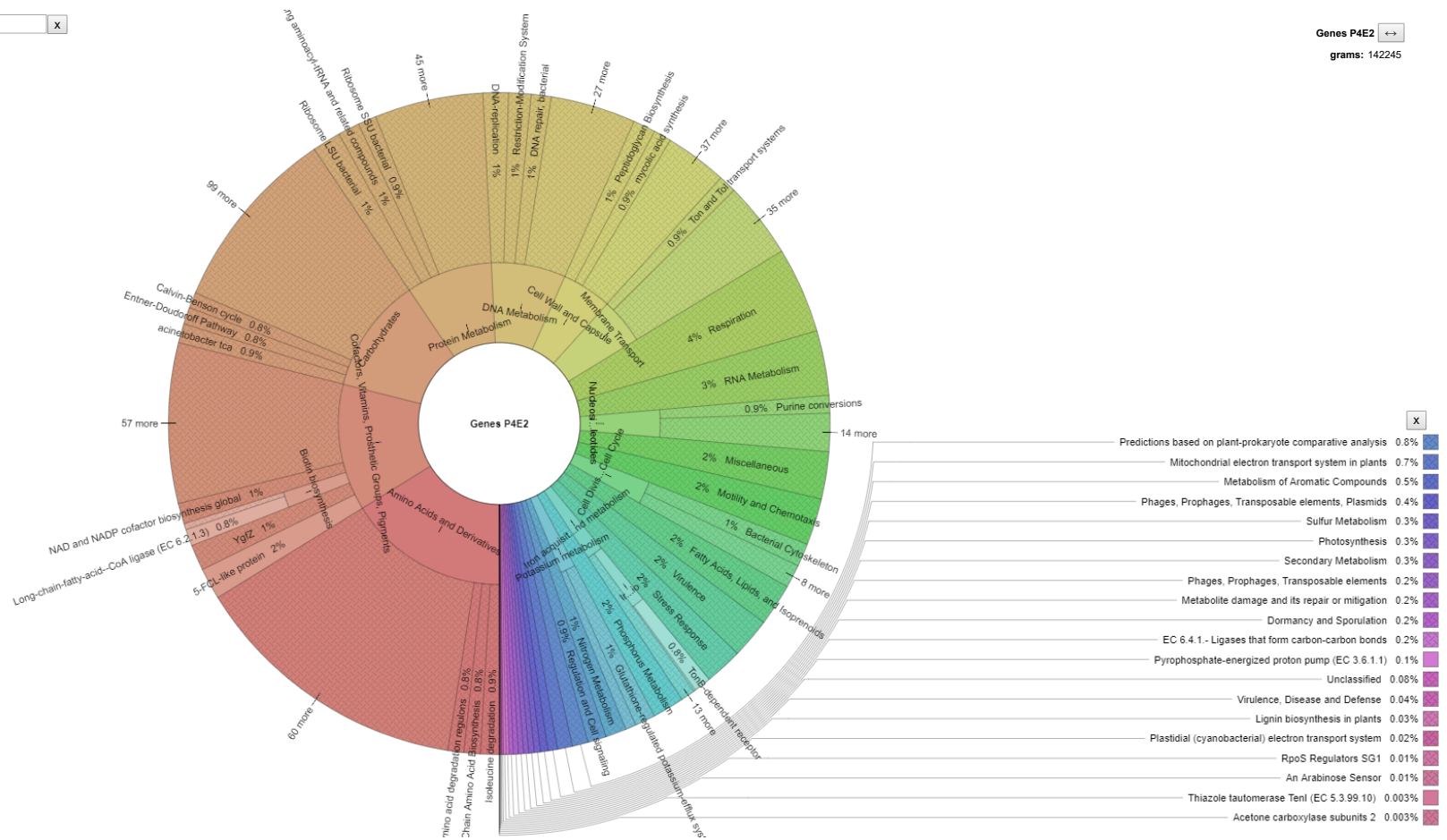


Krona

Max depth
 Font size
 Chart size
 Collapse

Genes P4E2

grams: 142245



**ANEXO G: ESTUDIO METAGENÓMICO DE SISTEMAS DE DEPOSITACIÓN DE YESO DEL
SALAR DE LLAMARA.**

INFORME DE AVANCE 3, ANEXO 10

**Subgerencia de Medio Ambiente N&Y
Gerencia de Estudios y Medio Ambiente Nitratos Yodo
Vicepresidencia Operaciones Nitratos Yodo**

MAYO 2018



Krona

Max depth
 Font size
 Chart size
 Collapse

Genes P4E3

grams: 115368

