

UCH-FC
30c-miabi
C824
c.1

**COMPOSICIÓN Y FUNCIÓN DE LAS COMUNIDADES
MICROBIANAS INVOLUCRADAS EN EL CICLO DEL
NITRÓGENO EN SUELO DE *Phaseolus vulgaris***



Tesis presentada a la
UNIVERSIDAD DE CHILE

en cumplimiento de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias – Mención

Microbiología

FACULTAD DE CIENCIAS

Por Pilar Corredor Cárdenas

Junio, 2004

Directores de Tesis

Dra. Margarita Carú M.

Dr. Karl-Paul Witzel

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile



INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado
presentada por el candidato:

Pilar Corredor Cárdenas

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al
grado de Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología, en el examen de Defensa de
Tesis rendido el día 21 de Junio de 2004

Directores de Tesis

Dra. Margarita Carú

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. Carú", written over a horizontal dotted line.

Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Romilio Espejo

Dr. Claudio Vásquez

Dr. Victor Cifuentes

Three handwritten signatures in blue ink, written over three horizontal dotted lines. The signatures are stylized and difficult to read.

*A mi familia y
a Thomas*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no pudo haber sido realizado sin la ayuda de muchas personas que merecen ser mencionadas.

En primer lugar quisiera agradecer a mi tutora en Chile, la Dra. Margarita Carú, porque siempre me apoyó en cada una de mis locuras y tuvo toda la paciencia con mi impaciencia.

Ich möchte Dr. Karl-Paul Witzel danken, weil er nicht nur ein Chef war, sondern auch ein großer Freund ist. Er ist eine der großartigsten Menschen, der mir jemals begegnet ist.

También quiero agradecerles a los profesores del programa de Microbiología de la Universidad de Chile, pero especialmente a la Dra. Rosalba Lagos por toda su ayuda y su constante atención, y a los miembros de la comisión evaluadora de este trabajo el Dr. Romilio Espejo por sus comentarios, el Dr. Davor Cotoras por el conocimiento que me brindo, el Dr. Claudio Vásquez por aceptar la responsabilidad y tomarla tan en serio, y el Dr. Victor Cifuentes por sus aportes sobre este trabajo.

A mis queridos amigos, Rafa, Ketty, Raquel, Patty, Bárbara, Pancho, Mauricio, Carola, por hacer de Chile un lugar donde vivir, compartir y reír.

En la Universidad de Chile quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio Mónica, Juanita, Marco, Lorena, Betty, Julieta y Ana, por los gratos momentos compartidos. También quiero agradecer a Marisol Maira y a Rosita, por su gran colaboración.

In Deutschland möchte ich Karina, Karin, Vero, Sunny, Sara, Bastian, Sonja, Dacha, Helga und Cristina danken, dass wir eine wunderschöne Zeit verbracht haben und gute Freunde geworden sind, mit denen ich gerne zusammengewohnt habe.

Ich möchte Professor Winfried Lampert danken für die Möglichkeit, am Max-Planck-Institut arbeiten zu können.

Im Max-Planck-Institut möchte ich mich besonders bei Gundulla Eller, Peter Deines, Claudia Schelker, Ines Schultz, Sybille Liedtke, Renate Koht, Manuela Bernhart und Ilka Dankert bedanken für ihre Hilfe und ihre Geduld. Und ich möchte auch Ilonka, Gisep, Gianluca, Ylenia, Claes, Lena, Martin, Joachim, Raquel, Matthias, Heidrun und Kirsten nicht vergessen, es war nett mit Euch!

Außerdem möchte ich dem DAAD, besonders Frau Firlzlaff, danken für die Möglichkeit meine Doktorarbeit durchführen zu können.

TABLA DE CONTENIDOS

Agradecimientos	iii
Tabla de contenidos	iv
Indice de Tablas	viii
Indice de Figuras	ix
Lista de abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. INTRODUCCION	1
1.1.- Visión clásica del ciclo del nitrógeno	1
1.1.1.- Fijación del nitrógeno	3
1.1.2.- Nitrificación	5
1.1.3.- Desnitrificación	9
1.2.- Vías recientes de conversión del nitrógeno	11
1.2.1.- Acoplamiento de la nitrificación y la desnitrificación	11
1.2.2.- Desnitrificación de las bacterias nitrificantes	12
1.2.3.- Desnitrificación aeróbica	12
1.2.4.- Anammox	13
1.2.5.- Nitrificación heterotrófica	14
1.3.- Comunidades microbianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en suelo rizosférico de <i>Phaseolus vulgaris</i> : un modelo	15
1.3.1.- Hipótesis	16
1.3.2.- Objetivos	16
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1.- Métodos bioinformáticos	17
2.1.1.- Análisis de secuencias	17
2.1.2.- Diseño de partidores	17
2.1.3.- T-RFLP <i>in silico</i>	17
2.1.4.- Selección de las sondas y diseño de sondas específicas para	18

FISH

2.2.- Métodos experimentales	18
2.2.1.- Cepas y condiciones de cultivo	18
2.2.2.- Suelo y muestreo	19
2.2.3.- Recolección de nódulos rizobiales y aislamiento de cepas desde el nódulo	20
2.2.4.- Análisis de suelo	20
2.2.5.- Análisis de la planta	21
2.2.6.- Mediciones de actividad	21
2.2.6.1.- Ensayo de bloqueo por acetileno	21
2.2.6.2.- Ensayo de reducción del acetileno (ARA)	21
2.2.7.- Técnicas de biología molecular	22
2.2.7.1.- Extracción de DNA de suelo	22
2.2.7.2.- Extracción de DNA de cultivo	22
2.2.7.3.- Extracción de DNA de nódulos	22
2.2.7.4.- PCR del 16S rDNA	23
2.2.7.5. PCR específico del 16S rDNA para AOB	24
2.2.7.6. Amplificación del gen <i>amoA</i>	25
2.2.7.7. Amplificación de los genes <i>nirK</i> y <i>nirS</i>	25
2.2.7.8. Amplificación del gen <i>nifD</i>	26
2.2.7.9. Amplificación del gen <i>nifH</i>	27
2.2.7.10. DGGE	27
2.2.7.11. T-RFLP	28
2.2.7.12. Preparación de comunidades artificiales de diazótrofos	28
2.2.7.13. Clonamiento y secuenciación de DNA	29
2.2.7.14. FISH	30
2.2.8. Análisis de los datos	30
2.2.8.1. Análisis de resultados de DGGE	30
2.2.8.2. Análisis de T-RFLP	31
2.2.8.2.1. Normalización de los datos	31
2.2.8.2.2. Análisis de los resultados	31

2.2.8.3. Análisis de secuencias	32
3.- RESULTADOS	33
3.1.- Efecto de la planta en la disponibilidad de nitrógeno	33
3.2.- Efecto de la adición de nitrato en el crecimiento de la planta	34
3.3.- Cambios en la composición de las comunidades bacterianas del suelo	34
3.4.- Composición del gremio de bacterias oxidadoras de amonio (AOB)	36
3.4.1.- Cambios en la composición de AOB analizados con el marcador 16S rDNA	36
3.4.2.- Análisis de AOB mediante la amplificación del marcador funcional <i>amoA</i>	41
3.4.2.1.- Análisis bioinformático de las secuencias <i>amoA</i>	41
3.4.2.2.- Evaluación de los partidores de PCR para <i>amoA</i>	42
3.4.2.3.- Cambios en la composición de AOB analizados con el marcador <i>amoA</i>	45
3.5.- Composición y función del gremio de bacterias desnitrificantes	49
3.5.1.- Tasas de actividad de desnitrificación en suelo	49
3.5.2.- Análisis del marcador <i>nirK</i> por DGGE en cultivos puros y en muestras de suelo	49
3.5.3.- Análisis de la composición de bacterias desnitrificantes por T- RFLP	53
3.5.4.- Análisis bioinformático de la secuencia del gen <i>nirK</i>	54
3.6.- Composición y función del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofos)	56
3.6.1.- Tasas de fijación de nitrógeno en el suelo	56
3.6.2.- Estandarización del análisis de T-RFLP para el estudio de las comunidades de diazótrofos en el suelo	57
3.6.2.1.- Evaluación de la reproducibilidad del análisis de T-RFLP	57
3.6.2.2.- Simulación de una comunidad de diazótrofos	58
3.6.3.- Cambios en la composición de los ensambles de diazótrofos en el suelo	60
3.6.4.- T-RFLP como herramienta de identificación de diazótrofos	61

3.7.- Composición de bacterias rizobiales en suelo y nódulos	65
3.7.1.- Desarrollo de marcadores moleculares específicos para analizar la composición de poblaciones rizobiales	65
3.7.2.- Análisis de la composición de bacterias rizobiales en el suelo	66
3.7.3.- Análisis de la composición de bacterias rizobiales en nodulos	70
3.7.4.- Nódulos rizobiales: compleja asociación entre bacterias	74
3.7.3.2.- Presencia de bacterias oxidadoras de amonio (AOB) en los nódulos	74
3.7.3.3.- FISH	75
4.- DISCUSIÓN	79
4.1.- Efecto rizosférico de <i>P. vulgaris</i> en el suelo como modelo experimental	79
4.2.- Análisis de las comunidades microbianas en el suelo	79
4.3.- Análisis de marcadores funcionales versus 16S rDNA	83
4.4.- Actividad <i>in situ</i> versus composición de los gremios microbianos	86
4.5.- Composición bacterias rizobiales en suelo y en las poblaciones microsimbiontes	88
4.6.- Diversidad en los nódulos rizobiales: nuevas perspectivas	92
5. CONCLUSIONES	94
6. BIBLIOGRAFÍA	95

Indice de Tablas

Tabla 1.- Cepas utilizadas en este trabajo	19
Tabla 2.- Secuencias de los partidores utilizados en este estudio	24
Tabla 3.- Características del suelo al principio (T0) y al final del experimento (T3)	33
Tabla 4.- Carbono y nitrógeno foliar, relación C/N y tasas de fijación de nitrógeno en nódulos	34
Tabla 5. Identificación de los clones de 16S rDNA para AOB	39
Tabla 6.- Secuencias usadas en el análisis de <i>amoA</i>	41
Tabla 7.- Secuencias de los partidores para <i>amoA</i> analizados en este trabajo	43
Tabla 8.- Identificación de los clones de <i>amoA</i>	47
Tabla 9.- Comparación de la longitud de los fragmentos terminales (T-RFs) para las especies conocidas de bacterias desnitrificantes	54
Tabla 10.- Determinación del porcentaje de desviación experimental del análisis de <i>nifH</i> por T-RFLP	58
Tabla 11.- Desviación de la razón templado-producto en el PCR obtenidas para una mezcla conocida de templados	59
Tabla 12.- Número de fragmentos terminales (T-RFs) analizados para cada digestión de <i>nifH</i>	60
Tabla 13.- Comparación de los tamaños de los T-RFs experimentales y teóricos obtenidos en especies conocidas de diazótrofos.	63

Indice de Figuras

Figura 1.- Visión clásica del ciclo del nitrógeno en la biosfera	2
Figura 2.- Representación esquemática de la nitrificación	6
Figura 3.- Resumen de las etapas de la desnitrificación	10
Figura 4.- Reacciones involucradas en la nitrificación y desnitrificación acopladas	12
Figura 5.- Desnitrificación en bacterias nitrificantes	13
Figura 6.- Análisis de las comunidades bacterianas totales de suelo	35
Figura 7.- Análisis de las comunidades de AOB en el suelo	37
Figura 8.- Dendrograma mostrando las relaciones filogenéticas de las secuencias específicas del 16S rDNA de AOB en suelo	41
Figura 9.- Representación esquemática de los operones <i>amoCAB</i> en bacterias oxidadoras de amonio (AOB)	44
Figura 10.- Amplificación del gen <i>amoA</i> en <i>Nm. euroopaea</i> ATCC 19817	45
Figura 11.- Amplificación del gen <i>amoA</i> con los partidores para DGGE	45
Figura 12.- Análisis de la composición del gremio de AOB usando el marcador funcional <i>amoA</i>	46
Figura 13.- Dendrograma mostrando la relación de las secuencias de <i>amoA</i> en suelo	48
Figura 14.- Tasas de desnitrificación en suelo	50
Figura 15.- Amplificación del gen <i>nirK</i> en cepas estándar	52
Figura 16.- Estandarización del DGGE para los productos de PCR de <i>nirK</i> de <i>O. antrophii</i>	52
Figura 17.- Análisis del marcador <i>nirK</i> por DGGE en las muestras de suelo y los estándares	53
Figura 18.- Alineamiento múltiples de diferentes secuencias de <i>nirK</i> en la región blanco del partidior nirK1F	55
Figura 19.- Tasa de fijación de nitrógeno en los diferentes tratamientos	56
Figura 20.- Análisis de agrupamiento de los patrones de T-RFLP para el gen <i>nifH</i>	62

Figura 21.- Identificación potencial de los T-RFs en el suelo	64
Figura 22.- Estandarización del análisis de DGGE para los productos del gen <i>nifD</i>	67
Figura 23.- DGGE de los amplicones de <i>nifD</i> y <i>nifH</i> en las muestras de suelo	68
Figura 24.- Análisis de agrupamiento de los patrones de DGGE para <i>nifD</i> y <i>nifH</i>	69
Figura 25.- Arbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>nifD</i>	71
Figura 26.- Arbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>nifH</i>	72
Figura 27.- Composición de las poblaciones microsimbiontes en nódulos de <i>P. vulgaris</i>	73
Figura 28.- Análisis de los productos del 16S rDNA específicos para AOB en los nódulos de <i>P. vulgaris</i>	75
Figura 29.- Dendrograma mostrando la relación de las secuencias del 16S rDNA no rizobiales amplificadas en los nódulos	76
Figura 30.- FISH con la sonda específica de <i>Rhizobium</i>	77
Figura 31.- FISH en macerados de nódulos con las sondas específicas para <i>Variovorax/Comamonas</i>	78
Figura 32.- FISH con la sonda específica BONEAga	78

Lista de Abreviaturas

BLAST: basic local alignment search tool

DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis (electroforesis en geles con gradientes de desnaturalización)

dNTP: deoxiribonucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

PCA: principal component analysis (análisis de componentes principales)

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

SDS: dodecil sulfato de sodio

T-RFLP: terminal restriction length polymorphism (polimorfismo en los fragmentos de restricción terminales)

T-RFs: terminal restriction fragments (fragmentos de restricción terminales)

UF: unidades de fluorescencia

RESUMEN

La comprensión de la relación existente entre la diversidad microbiana y el papel biológico que cumple la microbiota en el ambiente es uno de los principales retos en ecología microbiana. En este trabajo se analizó el efecto rizosférico de *Phaseolus vulgaris* sobre la composición y función de los diferentes grupos microbianos involucrados en las principales etapas del ciclo del nitrógeno. A su vez, diferentes condiciones de riego, incluyendo o no la adición de nitrato, fueron evaluadas con el fin de definir si el nitrato afecta el establecimiento de la simbiosis en la planta o los otros procesos asociados con la conversión de nitrógeno.

La composición de los grupos microbianos que participan en fijación de nitrógeno, nitrificación o desnitrificación, fue determinada mediante la amplificación de genes funcionales específicos y la posterior resolución de las mezclas de amplicones por DGGE o T-RFLP así como mediante clonación y secuenciación. Partidores específicos previamente publicados en la literatura para la amplificación de 16S rDNA y diferentes genes funcionales (*amoA*, *nirS*, *nirK* y *nifH*) fueron utilizados para analizar la composición de las comunidades de bacterias nitrificantes, desnitrificantes y el gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno. En el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno, se diseñó además partidores específicos para la amplificación de dos genes que codifican para subunidades funcionales de la nitrogenasa (*nifD* y *nifH*) en bacterias rizobiales. Estos partidores fueron probados en poblaciones de bacterias rizobiales del suelo (vida libre) así como en poblaciones de microsimbiontes. La especificidad de los productos de PCR obtenidos fue confirmada mediante secuenciación.

Los resultados mostraron claramente el efecto rizosférico de la planta leguminosa y de las condiciones de riego sobre la composición y función de algunos grupos microbianos que participan en el ciclo del nitrógeno (por ejemplo, bacterias nitrificantes o bacterias rizobiales). Por el contrario, los cambios en la composición de la comunidad bacteriana total y en el gremio de diazótrofos no se correlacionaron claramente con el efecto rizosférico. La amplificación de marcadores moleculares específicos para bacterias desnitrificantes (*nirS* y *nirK*) no fue posible a pesar de las diferentes estrategias ensayadas. Sin embargo, las tasas de desnitrificación *in situ* mostraron que la actividad de este grupo está fuertemente influenciada por la presencia de la planta.

Adicionalmente, el análisis de las poblaciones simbióticas en nódulos de *P. vulgaris* mostró que las bacterias rizobiales asociadas con la planta presentan baja variabilidad. No obstante, se observó diferencias entre las bacterias cultivadas desde los nódulos y los resultados obtenidos al analizar extractos directos de DNA de nódulo. Asimismo, la presencia de posibles bacterias nitrificantes en los nódulos fue determinada por PCR y FISH, pero se desconoce el papel que estos microorganismos puedan estar cumpliendo en ese hábitat.

ABSTRACT

The understanding of the relationship between microbial diversity and the biological role of microbial communities is one of the main challenges in microbial ecology. We analyzed the rhizospheric effect of *Phaseolus vulgaris* on the composition and function of microorganisms involved in the main stages of the nitrogen cycle. Different watering conditions, considering either the addition or not of nitrate, were evaluated as well, in order to analyze its effect on the establishment of the symbiosis and on all the other processes affected by nitrate in the nitrogen conversion.

The composition of microorganisms performing nitrogen fixation, nitrification and denitrification was determined by amplification of selected genes by PCR and subsequent resolution of amplicons mixtures by DGGE or T-RFLP, as well as by cloning and sequencing. Previously published PCR primers for 16S rDNA and different functional genes (*amoA*, *nirS*, *nirK*, and *nifH*) were used to analyze nitrifying and denitrifying bacteria and the diazotroph guild. In the case of nitrogen fixing bacteria, we designed new specific primers for the amplification of two genes encoding for structural subunits of nitrogenase (*nifD* and *nifH*) in rhizobial bacteria. These primers were tested on free-living and symbiotic rhizobial populations. Sequences of PCR products obtained with these primers were determined confirming the retrieval of the expected targets.

Overall, the results showed the effect of the rhizosphere and the watering conditions on the composition and function of microorganisms involved in the nitrogen cycle such as nitrifiers or rhizobial bacteria. In contrast, the changes on the composition of bacterial communities and diazotroph guild did not correlate with the treatments assayed. Analyzing denitrifying bacteria, different strategies failed to amplify the specific functional markers

(nitrite reductase genes, *nirS* and *nirK*). Nevertheless, denitrification rates showed that the activity of this group was strongly altered by the presence of the plants.

Additionally, analysis of symbiotic communities showed that rhizobia associated with *P. vulgaris* displayed very low variability, even though, we observed differences between isolated bacteria obtained from the nodules and direct analysis of DNA nodules extracts. The unexpected presence of possible nitrifying bacteria in the nodules was determined by PCR and FISH, but the role of these microorganisms remains undetermined.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el ciclo del nitrógeno ha adquirido una importancia fundamental debido a que tanto la limitación como el exceso de nitrógeno, en sistemas naturales o en sistemas manejados por el hombre, altera significativamente su productividad y sustentabilidad. Las principales etapas de conversión del nitrógeno en la biosfera son llevadas a cabo exclusivamente por microorganismos y por consiguiente, la comprensión de la ecología y fisiología de los microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno constituye un área de intensa investigación (Kowalchuk & Stephen, 2001; Atlas & Bartha, 2002; Madigan et al., 2000). Adicionalmente, muchos de los microorganismos que participan en el ciclo del nitrógeno poseen un reconocido potencial biotecnológico, lo que ha incrementado la relevancia de los estudios que se concentran en su análisis (Atlas & Bartha, 2002). La aplicación de *Rhizobium* para incrementar la productividad agrícola (Kaneko et al., 2002) o el uso de grupos metabólicos específicos de bacterias oxidadoras del amonio como bioindicadores del impacto de contaminantes (Kowalchuk & Stephen, 2001) constituyen claros ejemplos de este hecho.

1.1.- Visión clásica del ciclo del nitrógeno.

El ciclo del nitrógeno involucra una gran variedad de reacciones de oxidación-reducción asociadas generalmente con sistemas de transporte de electrones (Ferguson, 1998). Teniendo en cuenta que el dinitrógeno elemental gaseoso (N_2) en la atmósfera es el principal reservorio activo de este elemento, el ciclo biogeoquímico podría comenzar con la fijación, un proceso que requiere mucha energía para reducir este elemento a amonio

(NH_4), el primer compuesto biológicamente disponible en el ciclo. Las etapas posteriores en la conversión del nitrógeno involucran la oxidación de amonio a nitrato (NO_3), proceso también denominado **nitrificación** y el retorno final del nitrógeno a su estado elemental en un proceso llamado **desnitrificación** o **respiración del nitrato** (Atlas & Bartha, 2002). Estos procesos en su conjunto constituyen una visión simplificada del ciclo del nitrógeno (Fig. 1). Sin embargo, nuevas rutas e intermediarios recientemente descritos en estos procesos sugieren que este ciclo biogeoquímico es más complejo. A continuación, se discuten las generalidades de los principales procesos involucrados en el ciclo del nitrógeno.

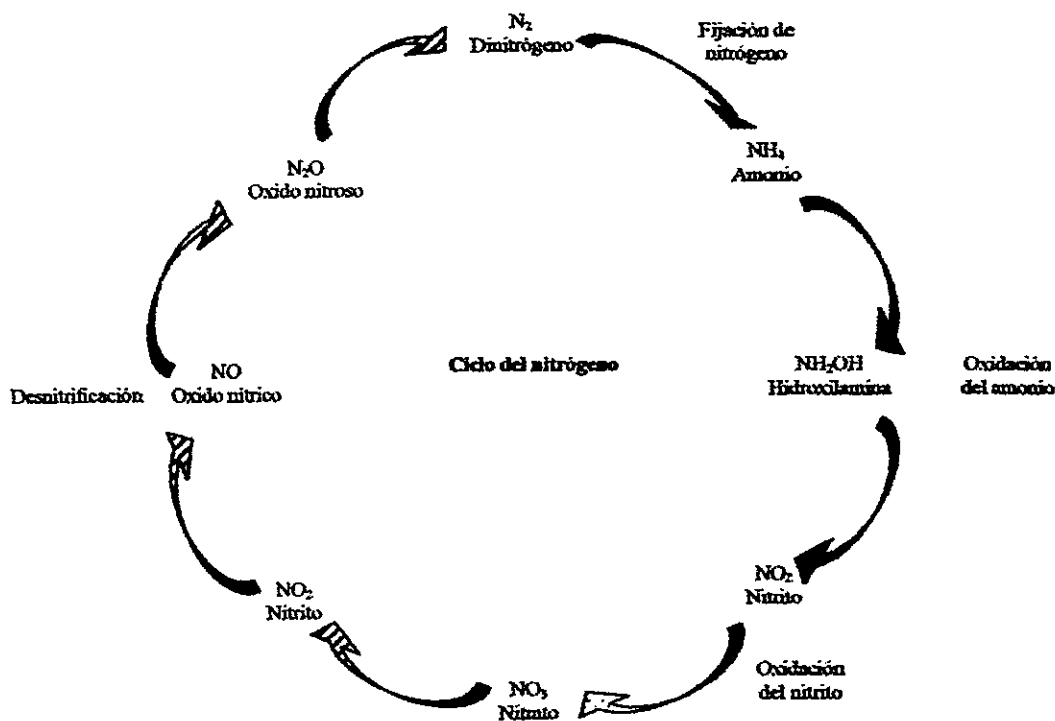


Figura 1.- Visión clásica del ciclo del nitrógeno en la biosfera. Las tres principales etapas microbianas: fijación de nitrógeno, nitrificación (oxidación del amonio y el nitrito) y desnitrificación son indicadas mediante flechas con diferente relleno.

1.1.1.- Fijación del nitrógeno.

La fijación del nitrógeno consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio. Este proceso puede llevarse a cabo química o biológicamente, pero en la actualidad se reconoce que la fijación biológica del nitrógeno (BNF) es cuantitativamente superior para suplir los requerimientos de nitrógeno en la mayoría de ecosistemas (Peters et al., 1995; Zehr et al., 2003). Todos los organismos fijadores de nitrógeno, también denominados **diazótrofos**, son procariotes y la BNF parece estar restringida exclusivamente al mundo microbiano. La diazotrofia está ampliamente distribuida entre microorganismos no relacionados que pertenecen a los dominios Arquea y Bacteria y por consiguiente, la afiliación filogenética raramente puede ser usada para inferir la capacidad de fijar nitrógeno (Zehr et al., 2003).

La fijación de nitrógeno se produce en una gran variedad de contextos metabólicos en ambientes terrestres y acuáticos. Asimismo, la diversidad de los diazótrofos también está dada por sus características fisiológicas, dado que la BNF es realizada tanto por microorganismos quimiótrofos o fotótrofos, así como por autótrofos o heterótrofos. Debido a su diversidad fisiológica, las estrategias dependientes de cultivo presentan severas limitaciones para el estudio de la composición de diazótrofos. Por consiguiente, aproximaciones moleculares que permiten analizar el grupo en su totalidad, han sido desarrolladas y probadas para la descripción de las comunidades de diazótrofos en diferentes ambientes (Zehr et al., 2003; Bürgmann et al., 2004).

Casi todos los diazótrofos descritos poseen en común la nitrogenasa (Nif), un complejo enzimático que lleva a cabo la reducción del dinitrógeno (Young et al., 1992; Zehr et al., 2003). La nitrogenasa presenta un alto grado de conservación en su secuencia aminoacídica, estructura y función en un variado espectro filogenético de microorganismos

(Fani et al., 2000), sugiriendo un origen ancestral de esta proteína en la evolución de la vida. Sin embargo, múltiples evidencias apoyan también la existencia de transferencia horizontal de los genes que codifican para este complejo enzimático entre diferentes linajes de procariotes (Zehr et al., 2003).

El complejo enzimático Nif está compuesto por dos metalo-proteínas que catalizan la reducción de N_2 , dependiente MgATP, para la producción de dos moléculas de NH_4 . Los dos componentes pueden ser purificados separadamente. El **Componente II** o **Proteína Fe**, es un homodímero γ_2 (proteína NifH), mientras que el **Componente I** o **Proteína MoFe** es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ (correspondiente a las proteínas NifD y NifK, respectivamente). La subunidad α contiene el sitio activo para la reducción del nitrógeno, típicamente un cluster $MoFe_7S_9$ (denominado cofactor FeMo). Sin embargo, en algunos microorganismos el Mo es reemplazado por Fe o V generando dos formas alternativas de la enzima (para las nitrogenasas alternativas la nomenclatura aceptada es Anf y Vnf en lugar de Nif). Las nitrogenasas alternativas se encuentran sólo en un conjunto limitado de diazótrofos y generalmente constituyen un sistema accesorio a la nitrogenasa Nif.

En casi todos los casos, los genes codificantes para las subunidades estructurales de la enzima se encuentran dentro de uno o varios operones (**operón *nif***), que se co-transcriben junto con un conjunto de proteínas involucradas en la regulación, activación, transporte del metal y síntesis del cluster (Raymond et al., 2004).

Las aproximaciones moleculares para el estudio de la diversidad de diazótrofos se basan principalmente en la amplificación por PCR de los genes *nif*, marcadores funcionales que contienen a su vez información para la actividad de fijación de nitrógeno. En general se acepta que la filogenia basada en los genes *nif* se corresponde en gran medida con las

relaciones establecidas a partir del 16S rDNA, brindando un soporte filogenético a los estudios ecológicos (Young et al., 1992; Zehr et al., 1997; Zehr et al., 2003; Raymond et al., 2004).

Diferentes aproximaciones experimentales basadas en la amplificación por PCR de *nifH* y seguidas por la separación de los amplicones mediante DGGE (Rosado et al., 1998; Piceno et al., 1999; Lovell et al., 2000; Bagwell et al., 2002), RFLP (Widmer et al., 1999; Poly et al., 2001), T-RFLP (Ohkuma et al., 1999) o más recientemente, microarreglos de DNA (Jenkins et al., 2004; Steward et al., 2004), constituyen las técnicas más aplicadas para analizar la diversidad de diazótrofos. El uso de los genes *nif* en ambientes acuáticos (Zehr et al., 2001; Brown et al., 2003) o terrestres (Poly et al., 2001; Bürgmann et al., 2004) ha revelado una gran diversidad de diazótrofos en ambientes naturales y sugiere que estos gremios o ensamblajes, difieran marcadamente entre diversos hábitats (Zehr et al., 2003).

1.1.2.- Nitrificación

La nitrificación es la oxidación autotrófica del amoníaco a nitrato, utilizando nitrito como intermediario (Fig. 2). Las oxidaciones sucesivas que se producen en la nitrificación son realizadas por dos grupos de microorganismos no relacionados. La primera parte, la conversión de NH_3 a NO_2 , es llevada a cabo por las **bacterias oxidadoras del amonio (AOB)**, también denominadas nitrificadores primarios. La segunda parte de la reacción, la oxidación de NO_2 a NO_3 es realizada por las **bacterias oxidadoras del nitrito (NOB)** u oxidadores secundarios (DeBoer & Kowalchuk, 2001; Wrage et al., 2001).

La oxidación del amonio es considerada la reacción limitante de la nitrificación y, por consiguiente, las AOB han recibido mayor atención en los últimos años (DeBoer &

Kowalchuk, 2001). La relevancia de este grupo microbiano ha sido subrayada en varias revisiones publicadas recientemente (DeBoer & Kowalchuk, 2001; Jetten 2001; Kowalchuk & Stephen, 2001; Wrage et al., 2001), así como por la publicación del genoma completo de *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 (Chain et al., 2003).

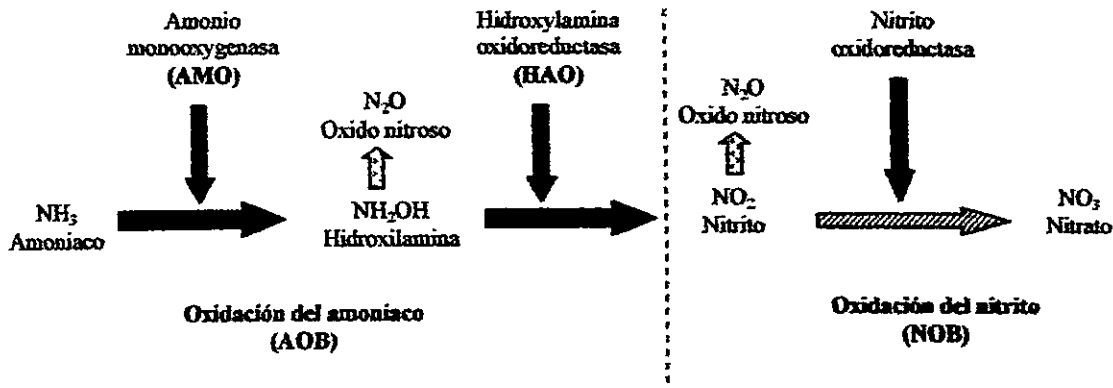


Figura 2.- Representación esquemática de la nitrificación. En la figura se indican las oxidaciones sucesivas y las enzimas responsables de cada proceso. Las reacciones correspondientes a la nitrificación primaria realizada por las AOB y la nitrificación secundaria llevada a cabo por NOB están separadas por la línea discontinua. Figura modificada de Wrage et al. (2001).

Las AOB son microorganismos quimiolitautotróficos que obtienen toda la energía para el crecimiento del acoplamiento de la oxidación del amonio al sistema de transporte de electrones. La enzima clave del proceso es la amonio monooxigenasa (AMO), una enzima unida a la membrana plasmática para la cual el sustrato es el amonio (NH_3), más que el amonio (NH_4). El NH_3 es convertido a hidroxilamina que es liberada en el periplasma y posteriormente es oxidada a nitrito por la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) (DeBoer & Kowalchuk, 2001; Kowalchuk & Stephen, 2001).

La relación filogenética de las AOB ha sido revisada recientemente (Purkhold et al., 2000; Purkhold et al., 2003). Tradicionalmente las AOB fueron clasificadas según su morfología

en cinco géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus*. Sin embargo, por análisis de homología de la secuencia del 16S rDNA, se ha propuesto el género *Nitrospira* que corresponde a la combinación de los géneros *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus* (Head et al., 1993; Bothe et al., 2000). Asimismo, el análisis del 16S rDNA de diferentes cultivos puros de AOB ha revelado que los miembros de este gremio microbiano pertenecen a dos linajes monofiléticos dentro de las proteobacteria: *Nitrosococcus oceanus* pertenece a la subclase Gamma de proteobacteria (**Gamma-AOB**), mientras que los géneros *Nitrosomonas* (incluyendo a *Nitrosococcus mobilis*) y *Nitrospira* (incluyendo a *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*) conforman un clado dentro de la subclase Beta (**Beta-AOB**) (Purkhold et al., 2000).

Las AOB se presentan en la mayoría de los hábitats aeróbicos en donde el amoníaco está disponible mediante la mineralización de la materia orgánica o por fuentes antropogénicas y, por ende, ellos son ubicuos en suelo, agua dulce y ambientes marinos (Kowalchuk & Stephen, 2001). Sin embargo, los estudios ecológicos de AOB fueron por mucho tiempo impedidos por las dificultades para aislar y cultivar estos microorganismos (Bothe et al., 2000; Kowalchuk & Stephen, 2001). Sin embargo, en la actualidad existen diversas estrategias independientes de cultivo, basadas principalmente en la amplificación del 16S rDNA por PCR, para la detección de AOB en muestras ambientales.

Adicionalmente, un marcador funcional, el gen que codifica para la subunidad alfa de la AMO (el gen *amoA*) se ha usado satisfactoriamente para analizar la composición y diversidad de las comunidades de AOB (Kowalchuk & Stephen, 2001; Norton et al., 2002; Nicolaisen & Ramsing, 2002). Se ha propuesto que *amoA* contiene mayores variaciones de secuencia que el 16S rDNA y por lo tanto, podría permitir una mayor discriminación entre poblaciones muy relacionadas de AOB (DeBoer & Kowalchuk, 2001).

Como ya se mencionó, el segundo paso de la nitrificación, la posterior oxidación de NO_2 a NO_3 , es una reacción sin intermediarios catalizada por la nitrito oxidoreductasa de las NOB. Al igual que las AOB, las NOB son bacterias quimilitoautótroficas Gram-negativas. Sin embargo, en estos microorganismos la energía para la fijación del CO_2 se origina de la oxidación de nitrito, pero los electrones liberados pueden ser transferidos únicamente a sustancias al final de la cadena respiratoria, por lo cual, un proceso denominado flujo reverso de electrones es el responsable por la producción de la energía (Wrage et al., 2001). Las relaciones filogenéticas de NOB son más complejas que las de las AOB y los miembros de este gremio microbiano pertenecen a las subclases Gamma (*Nitrococcus*), Alfa (*Nitrobacter*) y Delta (*Nitrospira* y *Nitrospina*) de las proteobacteria (Head et al., 1993; Teske et al., 1994). El estudio de las NOB ha sido impedido por las mismas dificultades encontradas en el análisis de las AOB, pero adicionalmente a las problemas asociados con las técnicas basadas en cultivo, el desarrollo de herramientas moleculares para la detección y caracterización de las NOB está limitado por la naturaleza polifilética de este grupo funcional. Sólo *Nitrobacter* ha sido detectado en el suelo y la distribución de otros miembros del gremio debe ser investigada (DeBoer & Kowalchuk, 2001; Kowalchuk & Stephen, 2001).

1.1.3.- Desnitrificación.

La desnitrificación, también denominada reducción disimilatoria del nitrato o respiración del nitrato, es la reducción en múltiples etapas del NO_3 hasta N_2 (Fig. 3). En el proceso se desarrollan varios intermediarios, tales como nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso, los cuales pueden ser liberados durante el proceso (Wrage et al., 2001; Jetten, 2001). Los

desnitrificadores están ampliamente distribuidos a lo largo de variados grupos taxónomicos, incluyendo *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Thiobacillus* y *Propionibacterium*, entre otros. La desnitrificación ha sido descrita también en arqueas e incluso en las mitocondrias de algunos hongos, pero la relevancia de la reducción de NO_3 en estos casos debe ser definida (Bothe et al., 2000).

En general, los desnitrificantes son anaerobios facultativos que son capaces de utilizar NO_3 en lugar de O_2 como aceptor final de electrones en la respiración. Sin embargo, en algunas especies se lleva a cabo únicamente una reducción parcial de NO_3 a NO_2 o N_2O . Las enzimas que catalizan las cuatro reacciones de reducción son la nitrato reductasa (Nar), nitrito reductasa (Nir), oxido nítrico reductasa (Nor) y la oxido nitroso reductasa (Nos) (Wrage et al., 2001; Philippot, 2002). La expresión de los genes que codifican para estas enzimas está sujeta a una compleja regulación. Condiciones anaeróbicas y la presencia de NO son los principales factores que regulan la expresión de estos genes (Bothe et al., 2003). Las bacterias desnitrificantes han sido aisladas frecuentemente de suelo, sedimento y ambientes acuáticos. La clásica aproximación molecular en ecología microbiana, basada en la amplificación del 16S rDNA, resulta poco adecuada cuando se quiere analizar la comunidad de desnitrificantes debido a la baja relación filogenética entre ellos. Consecuentemente, el uso de genes funcionales es especialmente importante para la aplicación de técnicas moleculares en el caso de la desnitrificación (Philippot, 2002). Genes como *nar*, *nor*, *nos*, *nirS* y *nirK*, son altamente diversos y funcionalmente redundantes entre los desnitrificantes (Ferguson, 1998; Bothe et al., 2000; Philippot, 2002). Sin embargo, se ha postulado que ellos contienen regiones suficientemente conservadas que permitirían el desarrollo de sondas o de partidores para la amplificación por PCR de estos genes (Bothe et al., 2000).

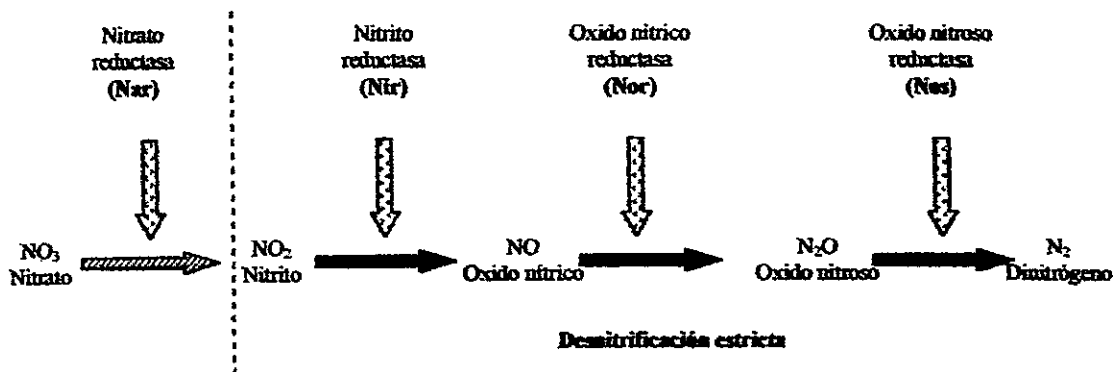


Figura 3.- Resumen de las etapas de la desnitrificación. Se indican las enzimas involucradas en cada etapa. La línea discontinua separa los procesos considerados como desnitrificación estricta. Figura modificada de Wrage et al. (2001).

La reducción de nitrito a óxido nítrico es considerada como el paso clave en la desnitrificación. Este proceso puede ser catalizado por dos enzimas no relacionadas que difieren en su estructura, la cobre- y la citocromo *cd₁*-nitrito reductasas, codificadas por los genes *nirK* y *nirS*, respectivamente (Zumft et al., 1997). El gen *nirS* ha sido ampliamente caracterizado en *P. stutzeri*, en donde forma parte de un grupo de genes que están involucrados en la producción de la enzima activa. Por el contrario, no se ha demostrado hasta el momento la participación de otro gen además de *nirK* en la síntesis de la nitrito reductasa asociada a cobre. Esta última ha sido purificada a partir de numerosas bacterias Gram-negativas (*Achromobacter cycloclastes*, *Nitrosomonas europaea* y *Rhodobacter spheroids*), bacterias Gram-positivas, e incluso del arqueon *Haloferax denitrificans* (Philipot, 2002). Estudios recientes sugieren que *nirK* predomina en suelos, mientras que *nirS* se encuentra especialmente en sedimentos y ambientes acuáticos (Braker et al 2000, Priemé 2002).

1.2.- Vías recientes de conversión del nitrógeno.

Nuevos procesos descubiertos en los últimos años han alterado la visión simplificada del ciclo del nitrógeno. Por ejemplo, la conversión lineal del NH_3 a NO_3 en la nitrificación, y el posterior uso del NO_3 por los desnitrificantes ha sido revisada considerando que ambos procesos pueden estar acoplados (Wrage et al., 2001). Asimismo, nuevas vías de conversión del nitrógeno como la **desnitrificación en nitrificantes**, la **desnitrificación aeróbica**, la oxidación anaeróbica del amoníaco (**Anammox**) o la **nitrificación heterótrofica**, merecen consideración particular.

1.2.1.- Acoplamiento de la nitrificación y la desnitrificación.

El término acoplamiento de la nitrificación y la desnitrificación destaca el hecho de que tanto el NO_2 como el NO_3 producidos durante la nitrificación, pueden ser utilizados inmediatamente por los desnitrificantes (Fig. 4). Este acoplamiento puede tener lugar en suelos donde condiciones favorables para ambos procesos se presentan en microhábitats cercanos (Wrage et al., 2001). Considerando simultáneamente factores tales como el contenido de carbono orgánico, N y O, la nitrificación no tiene lugar en suelos pobres en N, donde la nitrificación heterótrofica (ver más adelante) y la desnitrificación aeróbica (ver más adelante) pueden llevarse a cabo si el sistema posee suficiente C. La desnitrificación tiene lugar cuando existe alto contenido de C acoplado con bajo O, y ellos son capaces de competir en condiciones de alto o bajo N. Existe una región de sobreposición en la cual nitrificación y desnitrificación están acopladas.

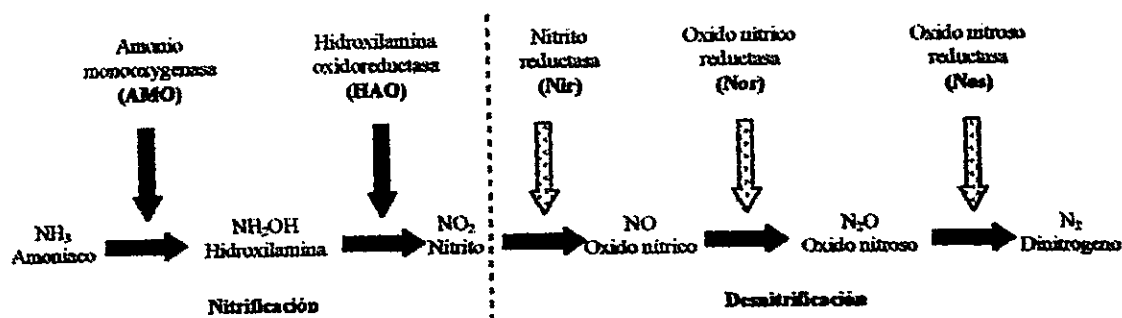


Figura 4.- Reacciones involucradas en la nitrificación y desnitrificación acopladas. Se indican las enzimas involucradas en cada reacción. Figura modificada de Wrage et al. (2001).

1.2.2.- Desnitrificación de las bacterias nitrificantes.

La desnitrificación de los nitrificantes es una ruta en la cual la oxidación de NH₃ a NO₂ es seguida por la reducción a NO y N₂O y N₂ (Fig. 5). Este proceso que puede contribuir a la pérdida de NH₄ en suelo se ha descrito principalmente en AOB, pero existen algunas evidencias que señalan que se presenta también en NOB (Wrage et al, 2001). Se cree que las enzimas requeridas para la desnitrificación en bacterias nitrificantes son esencialmente las mismas que las requeridas para la oxidación del amoníaco y la desnitrificación (Webster & Hopkins, 1996).

1.2.3.- Desnitrificación aeróbica.

El término desnitrificación aeróbica ha sido utilizado en diferentes contextos generando confusión acerca de este proceso. Este término se usa principalmente para hacer referencia a los microorganismos capaces de desnitrificar en presencia de oxígeno en el medio, pero

en algunos casos se refiere a la desnitrificación en sistemas óxicos. En estos últimos, la difusión parcial del oxígeno está restringida y por ende, la desnitrificación no tiene lugar en condiciones de aerobiosis en términos estrictos (Jetten et al., 2001).

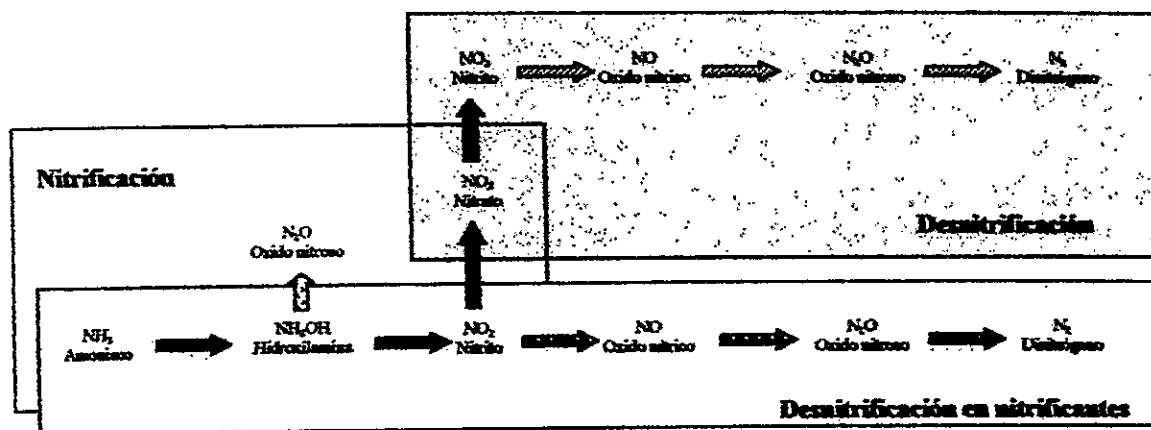


Figura 5.- Desnitrificación en bacterias nitrificantes. Este proceso se muestra comparado con la nitrificación y la desnitrificación. Figura modificada desde Wrage et al. (2001).

1.2.4.- Anammox.

Durante experimentos en una planta piloto de desnitrificación se observó que el amonio desaparecía del efluente del reactor a expensa de nitrato y con el concomitante incremento de N_2 . Este nuevo proceso fue denominado oxidación aeróbica del amonio o Anammox. Observaciones de las pérdidas de N reportadas en suelo, sedimentos y sistemas acuáticos indican que el proceso de Anammox puede ser más generalizado en la naturaleza de lo que se consideraba previamente (Jetten et al., 2001; Zehr & Ward, 2002).

Las bacterias responsables de este proceso se denominan **bacterias anammox** (miembros principales de un consorcio microbiano) y pertenecen al orden Planctomycetales. Estas

bacterias son peculiares en varios aspectos, incluyendo el uso de hidrazina como intermediario, la cual se localiza en el anammoxosoma (Zehr & Ward, 2002). Asimismo, este proceso es inhibido completamente por oxígeno en contraposición con la nitrificación, la cual requiere de este elemento como aceptor final de electrones (Jetten et al., 2003). Anammox puede representar entre 30-50% de la producción de N_2 en los océanos, modificando el balance previamente establecido de los intermediarios en el ciclo del nitrógeno (Zehr & Ward, 2002).

1.2.5.- Nitrificación heterotrófica.

La nitrificación heterotrófica es un proceso más frecuente en hongos que en bacterias y los primeros últimos juegan un papel importante en la nitrificación en condiciones tales como bajo pH, alto O y alta disponibilidad de materia orgánica. Aunque el sustrato, los intermediarios y los productos de la nitrificación heterotrófica son los mismo de la nitrificación, se considera que las enzimas de los dos procesos son diferentes (Wrage et al., 2001). La oxidación de NH_4 por estos microorganismos requiere de energía y no es un proceso ligado al crecimiento celular (DeBoer & Kowalchuk, 2001).

Dos rutas bioquímicas han sido propuestas para la nitrificación heterotrófica. La primera ruta fue descrita en bacterias heterotróficas como *Paracoccus denitrificans*, *Thisphaera pantotropha*, *Pseudomonas putida* y *Alcaligenes faecalis*. Estas bacterias poseen enzimas para la oxidación similares a las de AOB (DeBoer & Kowalchuk, 2001). Sin embargo, en el caso de *P. denitrificans* se ha probado que su AMO no es inhibida por C_2H_2 (Jetten, 2001).

La segunda ruta heterotrófica es conocida como desnitrificación fúngica. Se ha sugerido que en este proceso los compuestos nitrogenados reaccionan con radicales hidroxilo que

son producidos cuando peróxido de hidrógeno y superóxido están presentes. Esta condición está probablemente ligada a la lisis celular y a la degradación de lignina cuando se han liberado oxidasas y peroxidasas al ambiente (DeBoer & Kowalchuk, 2001).

Los nitrificantes heterótrofos pueden oxidar formas de N tales como urea o NH_3 y se ha señalado que este proceso puede generar NO_3 bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias heterótrofas contribuyen en menor proporción con la producción de N_2O bajo condiciones aeróbicas (Wrage et al., 2001). Teniendo en cuenta su plasticidad metabólica, la enumeración de estos nitrificantes ha sido muy difícil. Hasta el momento, es claro como se pueden interpretar la proporción de estos microorganismos cuando han sido aislados y cuantificados. Además las condiciones de cultivo empleadas para su enumeración solo se relacionan pobremente con las condiciones *in situ*, haciendo imposible determinar su relevancia funcional, por ejemplo en suelo (DeBoer & Kowalchuk, 2001).

1.3.- Comunidades microbianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en suelo rizosférico de *Phaseolus vulgaris*: un modelo.

La rizosfera se define como el suelo alrededor de las raíces que es influenciado por éstas. Esta influencia se genera, por ejemplo, mediante los exudados de la planta, los cuales constituyen fuentes de carbono que afectan a las comunidades microbianas (Kent & Triplett, 2002). La rizosfera de las plantas leguminosas resulta especialmente interesante debido a que estas plantas son capaces de establecer una de las más productivas interacciones simbióticas entre macro y microorganismos (Pawłowski & Bisseling, 1996; Zahran, 1999). Las raíces de las leguminosas son colonizadas intracelularmente por bacterias rizobiales (géneros *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*,

Mesorhizobium y *Sinorhizobium*), conduciendo a la formación de nódulos, órganos especializados en los cuales se lleva a cabo la fijación de nitrógeno.

1.3.1.- Hipótesis

Considerando que el nitrógeno es probablemente el principal elemento afectado por la interacción *Rhizobium*-leguminosa, nosotros postulamos como hipótesis de este trabajo que las comunidades microbianas, especialmente aquellas directamente involucradas con la conversión de nitrógeno en el suelo, serán afectadas por la presencia de la planta, en comparación con suelo no plantado y mantenido en iguales condiciones experimentales.

1.3.2.- Objetivos

- Analizar el efecto rizosférico de *P. vulgaris* (frijol común) en la composición y función de los diferentes microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno.
- Determinar si la adición de nitrato al suelo inhibe el establecimiento de la simbiosis o modifica la composición de los gremios microbianos del ciclo del nitrógeno.
- Determinar la composición de la población microsimbótica asociada a los nódulos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Métodos bioinformáticos.

2.1.1.- Análisis de secuencias.

Todos los análisis *in silico* realizados en este trabajo fueron llevados a cabo empleando secuencias disponibles en la red. Las secuencias fueron obtenidas en la base de datos del GenBank mediante la herramienta ENTREZ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). Cuando se emplearon secuencias de proteínas, estas fueron obtenidas del Swissprot usando Expasy (<http://www.expasy.org>). Los alineamientos de las secuencias se realizaron empleando los programas ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), o ClustalX v 1.81.

2.1.2.- Diseño de partidores.

Los nuevos partidores específicos para la amplificación de *nifD*, *nifH* o *amoA*, fueron diseñados con el programa GenFisher (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin>) o mediante inspección visual de los alineamientos. La especificidad de los partidores fue evaluada en la base de datos utilizando el programa BLAST, con las condiciones específicas para la búsqueda de secuencias cortas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La temperatura de desnaturalización de los partidores (T_m) fue calculada con el programa T_m de la Universidad de Minnesota (<http://alces.med.umn.edu/bin/rawtm.html>) utilizando los parámetros por defecto del programa (DNA 50 nM y sales 50 nM).

2.1.3.- T-RFLP *in silico*.

El análisis de simulación de T-RFLP fue realizado usando un programa diseñado durante este trabajo. El programa realiza una búsqueda en el computador de los partidores en una

secuencia y la posterior digestión con enzimas de restricción del amplicón. Se ensayaron dos estrategias de búsqueda de partidores para el PCR. Estas estrategias se diferenciaron en el manejo de los *mismatch*: una búsqueda de expresiones regulares, que no permitía *mismatch* y una búsqueda matricial con diferentes *mismatch* tolerados. Los amplicones obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción utilizadas en los análisis experimentales.

2.1.4.- Selección de las sondas y diseño de sondas específicas para FISH.

Las sondas de FISH fueron buscadas en la base de datos proBase.net (<http://www.microbial-ecology.de/probebase/>). Se seleccionó las sondas Eub338 (bacteria; Amman et al., 1990), ALF968 (rizobia; Neef, 1997), BET42a (Betaproteobacteria; Manz et al., 1992), BONE23A (Proteobacteria; Amman et al., 1996) y Cte (*Comamonas* spp., *Acidovorax* spp., *Hydrogenophaga* spp. and *Aquaspirillum* spp.; Schleifer et al., 1992). Adicionalmente, con base en los alineamientos de las secuencias de 16S rDNA obtenidas en los nódulos, se diseñó la sonda específica BONE23Aga reemplazando dos posiciones de la sonda BONE23A (G9 por A9 y A11 por G11).

2.2.- Métodos experimentales.

2.2.1.- Cepas y condiciones de cultivo.

Ocho cepas de bacterias rizobiales fueron analizadas en este trabajo (Tabla 1). Todas las bacterias rizobiales fueron crecidas en caldo agar manitol (YMB) a 30°C. Los cultivos fueron incubados durante una semana antes de la extracción de DNA.

Los cultivos puros utilizados como controles positivos y negativos de los experimentos de hibridación *in situ* (FISH) se indican en la tabla 1. Los cultivos fueron incubados en caldo

nutritivo durante 3 días. Las células fueron colectadas por centrifugación a 13.000 g por 5 min. Para hibridaciones inmediatamente después de la centrifugación de las células, el pellet celular fue resuspendido en 100 µl de una mezcla etanol:PBS (1:1). Para almacenamiento las células fueron procesadas según Ellen et al. (2001).

Tabla 1.- Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Identificación	Fuente
<i>Rhizobium tropici</i>	R899	CIAT
<i>Rhizobium meliloti</i>	R44	CIAT
<i>Rhizobium loti</i>	R2458	CIAT
<i>Rhizobium sp</i>	R1967	CIAT
<i>Rhizobium sp</i>	R3918	CIAT
<i>Bradyrhizobium</i>	R3101	CIAT
<i>Bradyrhizobium</i>	USDA 110	USDA
<i>Bradyrhizobium</i>	USDA 122	USDA
<i>Bradyrhizobium</i>	USDA 16	USDA
<i>Variovorax paradoxus</i>	DSM30034	DSMZ
<i>Comamonas testosterona</i>	DSM50244	DSMZ
<i>R. etli</i>	DSM11541	DSMZ

Las cepas provenientes del CIAT fueron enviadas por el Dr. Edmundo Barrios. Las cepas provenientes de la colección USDA fueron enviadas por el Dr. Peter van Bekum.

2.2.2.- Suelo y muestreo.

Suelo de un campo utilizado por largo tiempo para el cultivo de *Medicago sativa* (Alfalfa) fue traído al laboratorio, homogenizado y colocado separadamente en macetas de 5 l (aproximadamente 5 kg de suelo por maceta). Semillas de *Phaseolus vulgaris* variedad venus (Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA) fueron sembradas en la mitad de las macetas. Las muestras de suelo sembrado fueron codificadas como tratamiento P, mientras que las muestras de suelo no sembrado fueron designadas como tratamiento S. Las macetas fueron regadas día por medio con 150 ml de agua. Una vez a la semana, 10 ml adicionales de tres soluciones fueron aplicados: i) solución nutritiva de Hoagland (Arnold

& Hoagland, 1950) sin nitrato (H), ii) solución nutritiva de Hoagland con nitrato (N; 5 mmoles de KNO_3 y 5 mmoles de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), y iii) agua (W). Finalmente, seis tratamientos diferentes con tres réplicas cada uno fueron obtenidos de la combinación de suelo con o sin planta y las condiciones de riego (tratamientos PH, PN, PW, SH, SN, SW, respectivamente).

Muestras de suelo (2 cm^3) fueron obtenidas de los 2 primeros cm del suelo a los 3 (T0), 16 (T1), 40 (T2) y 60 (T3) días después de la siembra. Las muestras de suelo fueron congeladas a -20°C hasta la extracción de DNA.

2.2.3.- Recolección de nódulos rizobiales y aislamiento de cepas desde el nódulo.

En el tiempo T3, nódulos rizobiales fueron colectados de las raíces de las plantas de frijol. Los nódulos fueron almacenadas a -20°C hasta la extracción del DNA. Para el aislamiento de microsimbiontes, algunos nódulos fueron limpiados exhaustivamente mediante lavados sucesivos con agua destilada estéril en un ambiente estéril. Después del lavado, el contenido interno de los nódulos fue incubado en YMB por una semana. Cultivos puros fueron obtenidos por aislamiento de colonias y pases adicionales en el mismo medio.

2.2.4.- Análisis de suelo.

Características fisicoquímicas del suelo como pH, contenido de materia orgánica, conductividad eléctrica, nitrógeno disponible, fósforo disponible y potasio disponible fueron determinadas para T0 y T3 en el laboratorio de suelos del INIA, siguiendo procedimientos estándar. Adicionalmente el contenido total de C y N fue determinado en cada tiempo de muestreo empleando un analizador de elementos A2500.

2.2.5.- Análisis de la planta.

Las plantas de frijol fueron colectadas y secadas. Con el material seco se determinó el peso y el contenido total de C y N (INIA).

2.2.6.- Mediciones de actividad.

2.2.6.1.- Ensayo de bloqueo por acetileno.

Las tasas de desnitrificación en suelo fueron establecidas mediante el ensayo de bloqueo del acetileno (Alef & Nannipieri, 1995) que permite estimar las tasas de desnitrificación como la acumulación de N_2O debido al bloqueo de la reducción enzimática de este elemento a N_2 . Para el ensayo 2 g de suelo fueron colectados en frascos cerrados herméticamente. Los frascos fueron sellados y un 10% de la atmósfera interior fue reemplazada por acetileno (C_2H_2). El suelo fue incubado a $28^\circ C$ y la acumulación de N_2O fue monitoreada después de 6 h en un cromatógrafo de gases Shimadzu 8A equipado con un detector de captura de electrones.

2.2.6.2.- Ensayo de reducción del acetileno (ARA).

El ensayo de ARA fue modificado a partir de Alef & Nannipieri (1995) y Myrold (1997). Brevemente, 2 g de suelo fueron colectados en frascos cerrados herméticamente. Los frascos fueron procesados de forma similar a como se mencionó para el ensayo de bloqueo de C_2H_2 en donde se reemplaza un 10% de la atmósfera. El suelo se incubó a $28^\circ C$ y la producción de etileno fue monitoreada luego de 24 y 48 h de incubación. El etileno se determinó un cromatógrafo de gases Shimadzu 8A con detector de ionizador de llama.

El ensayo de ARA en nódulos se llevó a cabo de la misma forma previamente descrita considerando en este caso la recolección de 2-4 nódulos de la raíz de las plantas. En

nódulos la producción de acetileno se midió a las 0, 6 y 9 h de incubación, como se describió anteriormente.

2.2.7.- Técnicas de biología molecular.

2.2.7.1.- Extracción de DNA de suelo.

El DNA de suelo fue extraído a partir de muestras compuestas de las 3 réplicas de cada tratamiento usando el kit UltraClean Soil DNA (MoBio), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del DNA fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio. El DNA purificado fue diluido en agua estéril (1-2.5 ng/μl) para PCR. El DNA se almacenó a -20°C.

2.2.7.2.- Extracción de DNA de cultivo.

El DNA de las cepas rizobiales fue extraído usando el kit Wizard™ Genomic DNA purification Kit (Promega), con excepción de las cepas de *Bradyrhizobium*, cuyo DNA fue extraído usando el Kit UltraClean Soil DNA (MoBio).

2.2.7.3.- Extracción de DNA de nódulos.

El siguiente protocolo fue diseñado para la extracción de DNA de nódulos de *Rhizobium*. Los nódulos individuales fueron lavados 20 veces con agua estéril para remover posibles contaminantes por dilución. Finalmente, se realizó un lavado con *buffer* TES (Tris-HCl 0.2 M; EDTA 5 mM; NaCl 100 mM; pH 8.0). Cada nódulo fue macerado en 200 μl de TES estéril. Al macerado se adicionó lisozima (100 μg) y RNasa (50 μg) y se incubó por 30 min a 37°C. Posteriormente se adicionó 200 μl de TES y se incubó nuevamente por 30 min

a 37°C con proteinasa K (100 µg) y SDS (1% vol final). Se adicionó un vol de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) mezclando por inversión. Las muestras se incubaron 30 min en hielo. Los restos celulares se removieron por centrifugación a 13.000 g por 20 min. El DNA se recuperó por precipitación toda la noche con 0.1 vol de acetato de sodio 3M y 2 vol de etanol absoluto. El DNA se recuperó por centrifugación a 13.000 g por 15 min y se lavó con etanol 70%. El DNA de los nódulos fue resuspendido en TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 7,4). La concentración del DNA se evaluó en geles de agarosa al 0.8% como se mencionó anteriormente.

2.2.7.4.- PCR del 16S rDNA.

La amplificación del 16S rDNA fue realizada con los partidores Eub 9_27 y Eub 1542 (Brosius et al., 1978). Un PCR anidado se realizó después con los partidores P2 y P3 para DGGE (Muyzer et al., 1993). La reacción de PCR se realizó en 50 µl conteniendo 5 pmol de cada partidor, 1.5 mM MgCl₂, 1× *buffer* de PCR (10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl, pH 8,3), 200 µM de cada dNTP y 1 U de Taq polimerasa (Roche). La primera amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, *annealing* a 40°C por 45 s y extensión a 72°C por 90 s. En el PCR anidado se realizó un programa *touchdown* que consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida por 20 ciclos de desnaturación a 94°C por 30 s, *annealing* a 65°C por 45 s y extensión a 72°C por 90 s, disminuyendo la temperatura de *annealing* en 0.5°C en cada ciclo; posteriormente se realizaron 10 ciclos adicionales con una temperatura de *annealing* constante a 55°C, terminando con extensión

final a 72°C por 5 min. Las secuencias de todos los partidores empleados en este trabajo se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2.- Secuencias de los partidores utilizados en este estudio.

Gen	Partidor	Secuencia 5'-3'	Posición	Organismo de referencia	Referencia
16S rDNA	Eob 9_27	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	9-27	<i>E.coli</i>	Brosius et al., 1978
16S rDNA	Eob 1542	AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC	1525-1545	<i>E.coli</i>	Brosius et al., 1978
16S rDNA	NiA	CTT AAG TGG GGA ATA ACG CAT CG	137-160	<i>E.coli</i>	Voytek & Ward, 1995
16S rDNA	NiB	TTA CGT GTG AAG CCC TAC CCA	1213-1234	<i>E.coli</i>	Voytek & Ward, 1995
16S rDNA	βamof	TGG GGR ATA ACG CAY CGA AAG	141-161	<i>E.coli</i>	McCaig et al., 1994
16S rDNA	βamor	AGA CTC CGA TCC GGA CTA CG	1301-1320	<i>E.coli</i>	McCaig et al., 1994
16S rDNA	P3 (341f)	*CCT ACG GGA GGC AGC AG	341-358	<i>E.coli</i>	Muyzer et al., 1993
16S rDNA	P2 (534r)	ATT ACC GCG GCT GCT GG	518-534	<i>E.coli</i>	Muyzer et al., 1993
16S rDNA	907r	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	907-926	<i>E.coli</i>	Lane, 1991
16S rDNA	926f	AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG	907-926	<i>E.coli</i>	Lane, 1991
Vector	MI3f	OTA AAA CGA CGG CCA G	427-442*	pCR-Blunt vector (Invitrogen)	Invitrogen
Vector	MI3r	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	205-221*	pCR-Blunt vector (Invitrogen)	Invitrogen
<i>amoA</i>	<i>amoA332f</i>	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	332-349	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	Rotlauer et al., 1997
<i>amoA</i>	<i>amoA822r</i>	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	802-822	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	Rotlauer et al., 1997
<i>amoA</i>	<i>amoA34f</i>	GCG GCS AAG ATG CCG CC	34-51	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	Linburg, 1997
<i>amoA</i>	<i>amoA121f</i>	†ACC TAC CAC ATG CAC TT	121-137	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	Linburg, 1997
<i>amoA</i>	<i>amoA359rC</i>	GGG TAG TGC GAC CAC CAG TA	340-359	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	Linburg, 1997
<i>nifD</i>	NiDF431(GC)	†CAT CGA CGA GAT CGA GGA	431-448	<i>Rhizobium etli</i> p42d (21492658)	Este trabajo
<i>nifD</i>	NiDR781	GAC CAG TTG CCG ACC A	781-796	<i>Rhizobium etli</i> p42d (21492658)	Este trabajo
<i>nifH</i>	PolF	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	118-136	<i>Rhizobium etli</i> p42d (21492658)	Poly et al., 2001
<i>nifH</i>	PolR	ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA	456-475	<i>Rhizobium etli</i> p42d (21492658)	Poly et al., 2001
<i>nifH</i>	NiHF123(GC)	†CCG AAA GCG GAC TCC A	123-139	<i>Rhizobium etli</i> p42d (21492658)	Este trabajo
<i>nifH</i>	NiHR463	CCG CAT AGA GCG CCA TCA TCT	463-484	<i>Rhizobium etli</i> p42d (21492658)	Este trabajo
<i>nifH</i>	NiHR478	ATG TTG TTG GCG GCA T	478-497	<i>Rhizobium etli</i> p42d (21492658)	Este trabajo
<i>nifH</i>	PolRR	AGC GCC ATC ATC TCR CCG GA	456-475	<i>Rhizobium etli</i> p42d (21492658)	Este trabajo

*GC-clamp = CGC CCG CCG CGC GCG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG GG

†GC-clamp = CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GC

* Posiciones del vector.

2.2.7.5. PCR específico del 16S rDNA para AOB.

Los partidores NiA/NiB (Voytek & Ward, 1995) y βamof/βamor (McCaig et al., 1994) fueron usados para la amplificación específica del 16S rDNA en AOB. Estos partidores se utilizaron en un PCR anidado empleando como templado el producto de la amplificación con los partidores de bacterias. Las condiciones de PCR fueron idénticas a las que se

mencionaron en el PCR para el 16S rDNA, pero utilizando en la amplificación una temperatura de *annealing* de 57°C. Los productos específicos se utilizaron como templados en un PCR con los partidores P2 y P3 (Muyzer et al., 1993) para el análisis de DGGE en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

2.2.7.6. Amplificación del gen *amoA*.

Diferentes combinaciones de partidores fueron ensayadas para la amplificación del gen *amoA*. Finalmente para el análisis se seleccionó el producto amplificado con los partidores *amoA34f* y *amoA822r* (Tabla 2). Las condiciones de reacción fueron idénticas a las mencionadas anteriormente para el 16S rDNA, con excepción de la concentración de MgCl₂ que se incrementó a 3,8 mM y la temperatura de *annealing* que se disminuyó a 57°C. Para el DGGE, estos productos de PCR fueron usados como templado en un segundo PCR con los partidores *amoA121fGC* y *amoA360r* (Tabla 2). En este PCR un programa de amplificación *touchdown* fue realizado como se describió antes, pero con un cambio en la temperatura de *annealing* de 55 a 45°C en los primeros 20 ciclos.

2.2.7.7. Amplificación de los genes *nirK* y *nirS*.

Para la amplificación de los genes *nirK* y *nirS* se empleó los partidores *nirK1F-nirK5R* y *nirS1F-nirS6R*, respectivamente (Braker et al., 1998). El PCR para *nirS* se realizó como fue descrito anteriormente (Braker et al., 1998). Para la amplificación de *nirK* se realizó el PCR en condiciones idénticas a las mencionadas para el 16S rDNA, pero con un programa de amplificación que consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 57°C por 30 s, *annealing* a 57°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, con una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron

limpiados por multiscreen (Montage PCR plate, Millipore Inc) y resuspendido en 40 μ l de agua HPLC para posteriores amplificaciones.

Para DGGE el producto anterior se utilizó como templado en un PCR semi-anidado con cualquiera de los dos partidores incluyendo la *GC-clamp* publicada por Nicolaisen & Ramsing (2002). En el PCR para DGGE se utilizó el programa *touchdown* mencionado anteriormente, pero con un cambio en la temperatura de *annealing* de 55 a 45°C en la parte inicial.

Para la amplificación del gen *nirK* en el análisis de T-RFLP se siguió el protocolo propuesto por Avrahami et al. (2002) utilizando el partidor *nirK5R* marcado con 6-carboxil-x-rodamina (6-ROX) utilizando las condiciones mencionadas para el análisis de DGGE. Después del PCR los productos fueron purificados utilizando una placa de multiscreen (Montage PCR plate, Millipore Inc).

2.2.7.8. Amplificación del gen *nifD*.

El gen *nifD* fue amplificado con los partidores *nifDF431* y *nifDR781* (Tabla 2). Con el fin de obtener productos de PCR para DGGE se realizó un PCR semi-anidado adicionando una *GC-clamp* de 26 bp (Nicolaisen & Ramsing, 2002) al partidor *nifDF431*. El PCR se realizó en iguales condiciones a las mencionadas en el PCR del 16S rDNA pero con 10 pmol de los partidores. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, *annealing* a 58°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, con una extensión final a 72°C por 7 min. En el programa de amplificación semi-anidado se utilizó un programa de *touchdown* variando la temperatura de *annealing* de 68 a 58°C en los primeros 20 ciclos.

2.2.7.9. Amplificación del gen *nifH*.

En la amplificación del gen *nifH* se evaluó diferentes combinaciones de partidores indicados en la Tabla 2. Los productos de PCR para el análisis de DGGE fueron obtenidos amplificando con los partidores PolF-nifHR478 en el primer PCR y con los partidores nifHF124GC-nifHR463 en el PCR anidado. Las condiciones fueron iguales a las mencionadas para *nifD*, pero con una temperatura de *annealing* de 55°C en el PCR inicial y con una variación en el segundo PCR de 65 a 55°C en el *annealing*.

Para el análisis de T-RFLP un fragmento de aproximadamente 450 pb fue amplificado utilizando los partidores nifHF-nifHR (Rösch et al., 2002), utilizando las condiciones mencionadas para la amplificación del 16S rDNA y con un programa de amplificación compuesto de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, *annealing* a 52°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, con una extensión final a 72°C por 7 min. Este producto de PCR fue utilizado como templado en un segundo PCR con los partidores nifHF marcado con 5-carboxifluoresceína (FAM) y nifHR marcado con 6-carboxil-x-rodamina (6-ROX). Las condiciones de PCR fueron iguales pero se empleo un programa *touchdown* similar al descrito para el análisis de DGGE, variando la temperatura de *annealing* de 65 a 55°C en los 20 ciclos iniciales. Los productos combinados de tres reacciones de PCR independientes fueron purificados desde un gel de agarosa usando el kit Quiaquick PCR purification kit (Quiagen).

2.2.7.10. DGGE.

El análisis de DGGE se realizó en un aparato de electroforesis D-Gene System (BioRad) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se utilizaron geles de poliacrilamida (8%) con los siguientes gradientes de desnaturalización 30 al 60% (16S rDNA, *amoA*, *nifD* y *nifH*) y

30 al 80% (*nirK*). La estandarización del análisis de DGGE para los amplicones de los genes *nifD*, *nifH* y *nirK*, se realizó por electroforesis en geles con gradiente perpendicular y en experimentos de *time travel* (Myers et al., 1987; Muyzer & Smalla, 1998). Los geles fueron corridos a 200 V con 60°C por 6 h (16S rDNA y *amoA*) o 10 h (*nifD*, *nifH* y *nirK*). Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con plata (Sanguinetti et al., 1994) y se digitalizaron usando un escáner HP Scanjet 5470c.

2.2.7.11. T-RFLP.

Antes de la digestión, los productos de PCR fueron cuantificados utilizando el programa Molecular Analysis (BioRad). 10-20 ng de los productos marcados fueron digeridos con las enzimas de restricción *HaeIII*, *MspI*, *MboI* y con una doble digestión *HaeIII/MspI* (New England Biolabs). Las digestiones fueron llevadas a cabo en reacciones de 10 µl con 5 U de cada enzima en el *buffer* adecuado a 37°C por 12 h, las reacciones fueron detenidas calentando 10 min a 95°C. El DNA fue precipitado con etanol (BigDye 3.1v sequencing kit manual guidelines, Applied Biosystems) y resuspendido en 9 µl de una mezcla de ROX-500 (Applied Biosystems) diluido 1:60 en formamida HiDi (Applied Biosystems). El DNA fue desnaturalizado a 90°C por 2 min y enfriado a 4°C. Los fragmentos de restricción fueron separados en un secuenciador automático ABI 3100 con el módulo GeneScan36-POP4. Los datos fueron analizados en el programa GeneScan 3.1 (Applied Biosystems).

2.2.7.12. Preparación de comunidades artificiales de diazótrofos.

Productos de PCR del gen *nifH* obtenidos con los partidores *nifHF*-*nifHR* de las especies *R. meliloti* CIAT44, *R. tropici* CIAT899, *B. japonicum* USDA110 y *Acidithiobacillus*

ferrooxidans fueron usados como templado para preparar productos de PCR marcados para T-RFLP. Estos templados fueron combinados en proporciones 1:0.1:0.01:0.001, en cuatro combinaciones diferentes. Las diluciones de los templados se prepararon a partir de una solución inicial con una concentración de 1 ng/ μ l y por consiguiente la cantidad de DNA de cada especie en el PCR varió entre 1 a 0.001 ng. Además, en dos experimentos diferentes se probó el efecto de la presencia de una mezcla de DNA sobre las combinaciones ya descritas adicionando 1 ng de DNA del nódulo rizobial o DNA de suelo. Los productos de PCR marcados se obtuvieron como se describió anteriormente.

2.2.7.13. Clonación y secuenciación de DNA.

Los productos de PCR para las clonaciones fueron amplificados con la DNA polimerasa de alta fidelidad *Pfu* (Promega). En la reacción se utilizó un programa de *hot-start* a 80°C, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, *annealing* a 58°C (*amoA*) o 60°C (16S rDNA, *nifD* y *nifH*) por 30 s y extensión a 73°C por 3 min. Las reacciones fueron corridas por triplicado, combinadas y concentradas en una placa de multiscreen (Montage PCR plate, Millipore Inc). Los amplicones fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa y la banda del tamaño adecuado fue eluida del gel usando el kit SNAP (Invitrogen). Para la clonación se utilizó el kit Zero Blunt PCR Cloning kit (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para cada muestra, entre 48 a 96 clones fueron picados y el tamaño del inserto en el clon fue verificado por PCR. Los clones seleccionados fueron secuenciados utilizando el kit BigDye terminador v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) en un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems). Para la secuenciación de los productos de los genes específicos se empleó los partidores M13f y M13r del vector.

Para el 16S rDNA cuatro partidores adicionales (534r, 907r, 341f y 926f; Tabla 1) fueron usados para obtener la secuencia completa del clon.

2.2.7.14. FISH.

Para el análisis de hibridación *in situ* (FISH) las sondas fueron marcadas con fluoresceina y Cy3 (Thermo Electron Company, Germany). Las muestras de nódulos se obtuvieron de un segundo grupo de experimentos realizados en las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente. Los nódulos fueron colectados después de 60 días y procesados como sigue: primero fueron lavados 20 veces con PBS (pH 7.0), fijados inmediatamente en una solución fresca de paraformaldehído 4% en PBS por 4 días, y transferidos a una solución PBS:etanol (1:1) para su almacenamiento. Para el transporte las muestras a PBS.

Para la hibridación los nódulos fueron macerados en una solución fresca de PBS:etanol (1:1) y diluidos 10 veces. Las hibridaciones se llevaron a cabo de acuerdo con Eller et al. (2001), a 46°C por 5 h con concentraciones variables de formamida. Para las sondas Cte y ALF968 se utilizó un 20% de formamida. Para las sondas BONE23A, Bet42a y BONE23Aga se utilizó 35% de formamida. La sonda Eub338 fue usada en ambas condiciones. Las muestras se analizaron por microscopía confocal laser (CLSM) con un microscopio Axioplan2 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Las imágenes se integraron con el programa Image Analysis System GMBH v 3.00.

2.2.8. Análisis de los datos.

2.2.8.1. Análisis de resultados de DGGE.

Los patrones de DGGE fueron representados como presencia (1) o ausencia (0) de las bandas en una matriz binaria. La disimilaridad genética entre las muestras fue calculada

usando el coeficiente de Jaccard. Se construyó un dendrograma a partir de las distancias usando el método UPGMA (Unweighted-Pair Group Method with Arithmetic mean) en el programam TreeCon (Van de Peer & Wachter, 1994).

2.2.8.2. Análisis de T-RFLP.

2.2.8.2.1. Normalización de los datos.

El tamaño, altura y área de los fragmentos terminales (T-RFs) fueron calculados con el programa GenScan v3.1 (Applied Biosystems). Las diferencias en la cantidad de DNA analizado por muestra fueron normalizadas de acuerdo con Kaplan et al. (2001). La normalización se llevo a cabo calculando la cantidad de DNA de cada muestra como la suma de la fluorescencia total (en unidades de altura o área). Un factor de corrección se calculó para cada muestra dividiendo la cantidad de DNA más baja en el análisis entre la cantidad de DNA en la muestra dada. Los datos de cada *peak* fueron normalizados multiplicando por el factor de corrección. En los T-RFLP de las muestras de suelo realizados con ambos partidores marcados el umbral de fluorescencia fue definido en 5 unidades de fluorescencia (UF), mientras que para los experimentos con un solo partidior marcado el umbral de fluorescencia se definió en 100 UF.

2.2.8.2.2. Análisis de los resultados.

Después de la normalización los *peak* fueron definidos utilizando como criterio una desviación del $\pm 1\%$. Los datos fueron representados en matrices de presencia-absencia y se procesaron como se mencionó anteriormente para DGGE. Asimismo se realizó un análisis de componentes principales (PCA) usando el programa MVSP.

2.2.8.3. Análisis de secuencias.

Las secuencias fueron editadas utilizando el programa Autoassembler 2.1 (Applied Biosystems) para eliminar las posiciones del vector. La identidad de las secuencias fue evaluada utilizando el programa BLASTN (Altschul et al., 1997). Las secuencias de referencia utilizadas en las filogenias fueron obtenidas del GenBank. Las secuencias fueron alineadas en ClustalX v 1.81 y el árbol filogenético fue generado con el programa TreeCon (Van de Peer & Wachter, 1994) usando la distancia genética de Jukes y Cantor y el algoritmo de agrupamiento *Neighbor-joining*. Un análisis de *bootstrap* con 100 muestreos fue realizado para determinar la confianza de las filogenias.

3. RESULTADOS

3.1.- Efecto de la planta en la disponibilidad de nitrógeno.

Para determinar el efecto de la planta sobre las características fisicoquímicas del suelo, se midieron factores edáficos tales como pH, materia orgánica, nitrógeno disponible, entre otros, en los tratamientos con y sin planta para los tiempos T0 y T3 del ensayo. Factores como el pH y el potasio disponible no variaron con respecto a la presencia o no de la planta, mientras que el porcentaje de materia orgánica, la conductividad eléctrica y el contenido de fósforo se incrementaron en ambas condiciones (Tabla 3). El balance de C/N permaneció invariable en los muestreos del ensayo para los tratamientos con y sin planta, registrándose un valor cercano a 12 característico de suelos agrícolas. El nitrógeno disponible, el factor más importante en este experimento, disminuyó en todos los tratamientos con planta (PH, PN y PW) de 10 mg/kg en T0 a 7-8 mg/kg en T3. En comparación, en los tratamientos sin planta el nitrógeno disponible se incrementó a 24-28,5 mg/kg en T3 (Tabla 3).

Tabla 3.- Características del suelo al principio (T0) y al final del experimento (T3). Todos los valores son el promedio de dos determinaciones independientes.

Tratamiento	Tiempo	pH	Materia orgánica (%)	Conductividad eléctrica (dS/m)	Nitrógeno disponible (mg/kg)	Fósforo disponible (mg/kg)	Potasio disponible (mg/kg)
Suelo inicial	T0	8,05	3,9	1,3	10,0	37,0	199,0
PH	T3	7,95	4,6	2,85	7,5	47,0	173,5
PN	T3	7,9	4,55	2,35	6,5	46,5	161,0
PW	T3	8,0	4,4	2,2	7,0	48,0	170,0
SH	T3	7,95	4,6	2,5	24,0	53,5	184,0
SN	T3	7,95	4,6	2,45	28,5	50,0	183,5
SW	T3	7,9	4,8	2,4	27,0	54,0	181,0

3.2.- Efecto de la adición de nitrato en el crecimiento de la planta.

En las distintas condiciones de riego evaluadas (solución de Hoagland con o sin nitrato y agua), se obtuvo valores similares de la relación de C/N en las plantas de *P. vulgaris*. La nodulación y las tasas de fijación de nitrógeno en los nódulos tampoco presentaron variaciones significativas en las diferentes condiciones de riego (Tabla 4).

Tabla 4.- Carbono y nitrógeno foliar, relación C/N y tasas de fijación de nitrógeno en nódulos. Los resultados de C y N foliar, y la relación C/N son el promedio de 2 determinaciones independientes. Las tasas de fijación de nitrógeno son el promedio de 3 determinaciones independientes después de 6 h de incubación.

Tratamiento	%N	%C	Relación C/N	Producción de etileno (ppm/h)
PH	2.8	49.4	18.05	829.83
PN	3.1	50.1	16.20	653.83
PW	2.7	52.4	19.62	595.96

3.3.- Cambios en la composición de las comunidades bacterianas en suelo.

Los cambios en la composición de las comunidades bacterianas en suelo plantado con *P. vulgaris* o en suelo sin plantar, se determinaron mediante la comparación de los patrones de DGGE de los amplificadores por PCR obtenidos para el gen 16S rDNA (Fig. 6A). Algunas bandas en el patrón cambiaron significativamente entre las muestras reflejando modificaciones en la composición de la comunidad bacteriana total. Sin embargo, los patrones se caracterizaron por la presencia de numerosas bandas débiles, que podrían corresponder a miembros de la comunidad con menor abundancia.

Los patrones de DGGE fueron interpretados en una matriz binaria para analizar la similitud de las muestras (Fig. 6B). Los resultados del análisis de agrupamiento mostraron que los cambios observados no se relacionaron con el efecto rizosférico o las condiciones de riego y por ende, la evaluación de gremios microbianos específicos puede ser en una

aproximación más adecuada para observar el efecto rizosférico de *P. vulgaris* o las condiciones de riego.

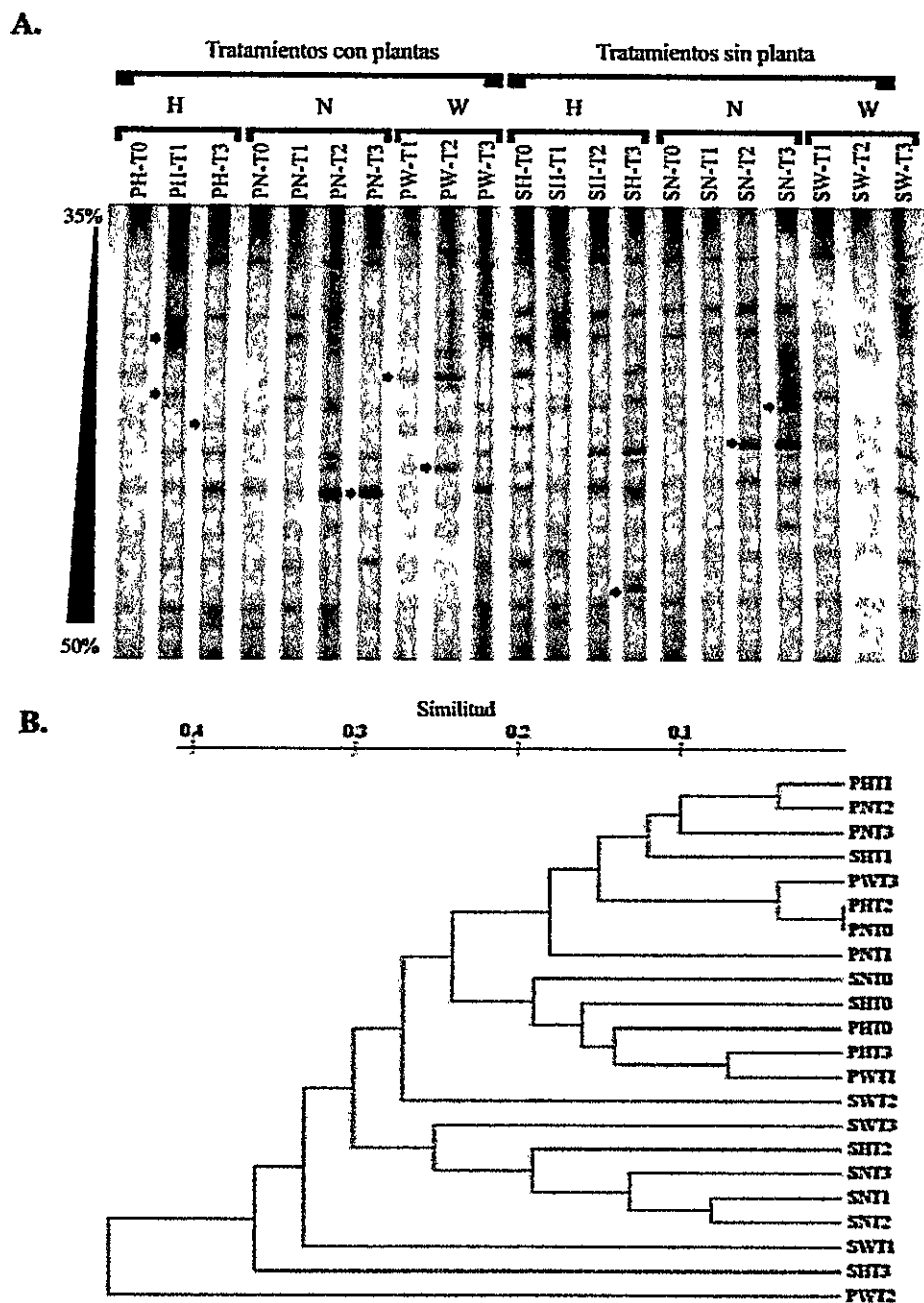


Figura 6.- Análisis de las comunidades bacterianas totales del suelo. A. DGGE de amplicones del 16S rDNA. B. Análisis de agrupamiento con los resultados de los patrones de DGGE. Las fechas indican cambios significativos en los perfiles de DGGE.

3.4.- Composición del gremio de bacterias oxidadoras de amonio (AOB).

3.4.1.- Cambios en la composición de AOB analizados con el marcador 16S rDNA.

La composición del gremio de bacterias oxidadoras del amonio en suelo plantado con *P. vulgaris* en comparación con suelo sin plantar fue determinada mediante el análisis de polimorfismo en las secuencias de amplicones específicos del gen 16S rDNA. En el análisis se emplearon los partidores NitA/NitB (Voytek & Ward, 1995) y β amof/ β amor (McCaig et al., 1994) que son específicos para Beta-AOB (Utaker & Nes, 1998).

El DNA de cinco cultivos de Beta-AOB fue incluido en el análisis. En estas bacterias se observó una banda en el DGGE de acuerdo con la existencia de un único operón ribosomal en estos microorganismos (Purkhold et al., 2000; Kowalchuk & Stephen, 2001; Chaim et al., 2003). La posición de las bandas en el gradiente permite separar las cepas del género *Nitrosomonas* que producen una banda entre 38-43%, de cepas del género *Nitrospira* que producen una banda entre 50-53%. En el caso de las muestras de suelo se identificaron bandas correspondientes a ambos géneros, así como bandas que no se relacionaron con ninguno de ellos (Fig. 7A).

Los patrones de DGGE se interpretaron como datos de presencia-ausencia para el análisis de agrupamiento. Los resultados mostraron la asociación de las muestras en dos grupos relacionados con el tiempo del muestreo, en donde el primer grupo correspondió a las muestras tomadas en los tiempos T0 y T1, mientras que el segundo grupo correspondió a las muestras de los tiempos T2 y T3. Dentro de estos grupos, se observó la separación de las muestras de acuerdo con la presencia o no de la planta, lo que fue más claro en el grupo de los tiempos finales de muestreo T2 y T3 (Fig. 7B).

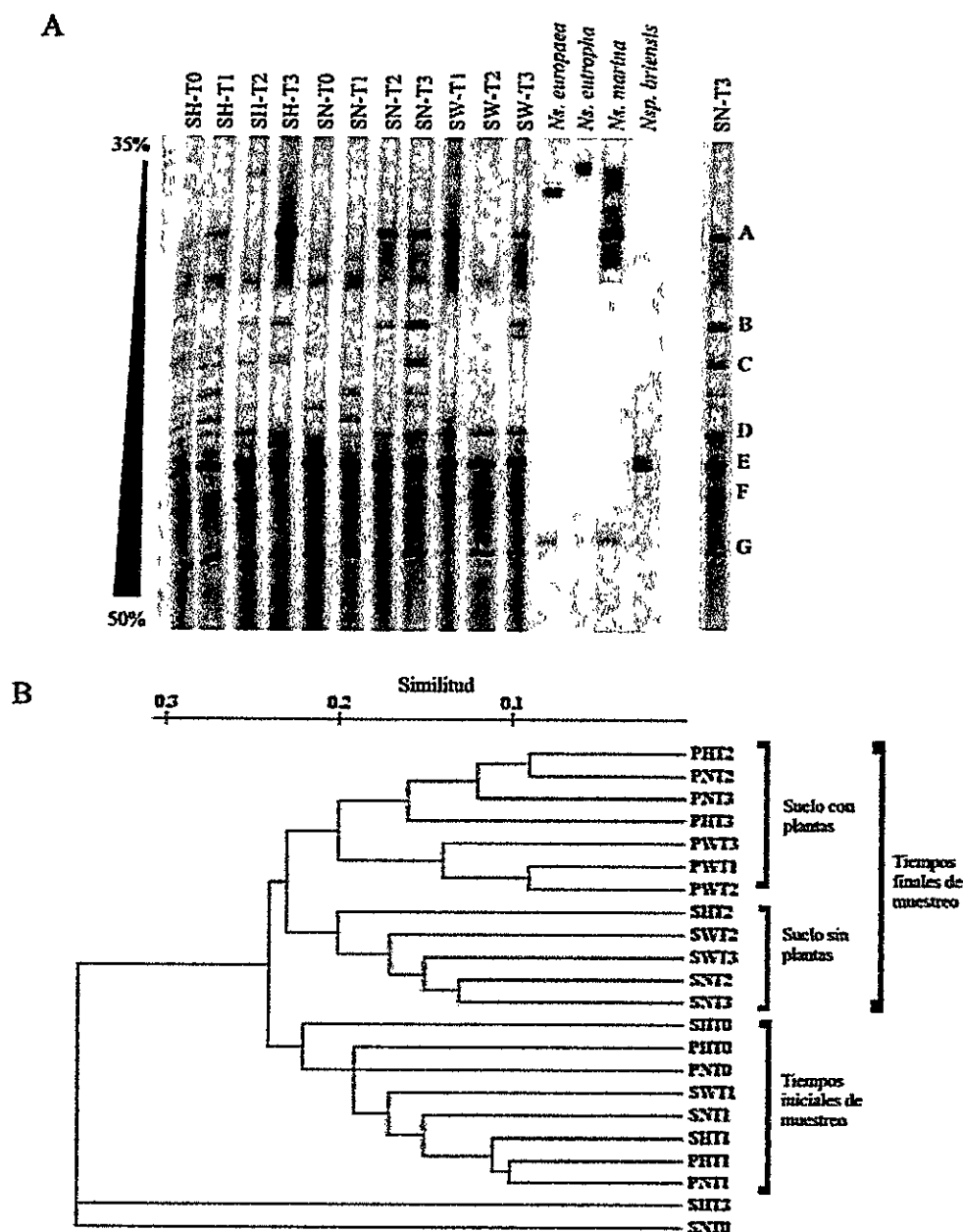


Figura 7.- Análisis de las comunidades de AOB en el suelo. A. Resultados del DGGE con los partidores NitA/NitB en suelo sin plantar. Los grupos de DGGE establecidos en el análisis de las librerías de clones son indicados con las letras a la derecha (para detalles ver Tabla 5). B. Análisis de agrupamiento por el método de UPGMA de los patrones de DGGE obtenidos con ambas combinaciones de partidores específicos.

Con el fin de determinar la composición del gremio de AOB en el suelo los productos de PCR del gen 16S rDNA amplificados con los partidores específicos NitA/NitB se clonaron y secuenciaron. Para la clonación se seleccionó las muestras de suelo PWT3 y SNT3 debido a que estas muestras presentaron las bandas más representativas de los patrones de DGGE obtenidos en la mayoría de las muestras de suelo.

Al comparar las secuencias de 55 clones con la base de datos, se obtuvo 10 secuencias representativas de las librerías. Estos clones se analizaron por DGGE y los patrones obtenidos se compararon con los patrones de amplicones de las muestras de suelo, para definir la correspondencia con las bandas previamente observadas en el análisis de DGGE en suelo, estableciéndose 7 grupos de migración (Fig. 7A y Tabla 5).

En aquellos clones que correspondieron en la búsqueda por BLAST a bacterias AOB típicas como por ejemplo *Ns. communis* (SNT3-50), *Np. multiformes* (SNT3-95) y *Nitrosospira* sp. NpAV (SNT3-61), las bandas en el análisis de DGGE fueron coincidentes con las bandas observadas en las cepas de referencia de dichos géneros. Como se observa en la Figura 7A, estos clones representaron los grupos de migración A, E y F. El análisis por BLAST de la secuencia del clon dominante de las librerías, PWT3-1, produjo como secuencia más relacionada una bacteria que degrada MTBE, la cual correspondió al grupo de migración D.

El análisis filogenético de las secuencias de los clones mostró que aquellas secuencias relacionadas en el BLAST con AOB se agruparon con secuencias del gen 16S rDNA de bacterias AOB (Fig. 8), mientras que el análisis filogenético de la secuencia del clon PWT3-1, mostró que dicha secuencia se relacionó con la secuencia del gen 16S rDNA de la bacteria que degrada MTBE, así como con diversas betaproteobacterias no cultivadas (Fig. 8).

Tabla 5. Identificación de los clones de 16S rDNA para AOB. Clones obtenidos con los partidores NitA/NitB. Se indican los grupos de clones co-migrando con bandas en los patrones de DGGE.

Grupo DGGE	Identificación del clon	Long (pb)	Clones analizados	% Clones analizados	Secuencia más relacionada	Acceso	Identidad %*	Secuencia adscrita a una bacteria descrita**	Acceso	Identidad %*
A	SNT3-50	700	9	16.7	<i>Nitrosomonas communis</i>	AJ298732	97	<i>Nitrosomonas communis</i>	AJ298732	97
A	SNT3-55	726	10	18.5	Uncultured beta proteobacterium	AF351571	93	<i>Ralstonia</i> sp. 1244a	AB054960	90
B	SNT3-65	798	1	1.9	Uncultured bacterium clone KDS-121	AY188315	96	Uncultured <i>Aquabacterium</i> sp. Clono II-8	AY218738	95
C	PWT3-1	844	26	48.1	MT3E-degrading bacterium PM1	AF176594	98	<i>Leptothrix</i> sp. MBIC33364	AB015048	96
D	SNT3-57	775	3	5.6	<i>Leptothrix</i> sp. MBIC33364	AB015048	94	<i>Leptothrix</i> sp. MBIC33364	AB015048	94
E	SNT3-95	600	1	1.9	<i>Nitrosospira multiformis</i>	AB070984	99	<i>Nitrosospira multiformis</i>	AB070984	99
F	SNT3-61	800	1	1.9	<i>Nitrosospira</i> sp. NpAV	Y10127	99	<i>Nitrosospira</i> sp. NpAV	Y10127	99
G	PWT3-12	797	3	5.6	Uncultured bacterium clone KD8-118	AY218683	97	<i>Aquabacterium</i> sp. Aqua2	AF089858	96
G	SNT3-74	800	10	18.5	Uncultured beta proteobacterium	AF351571	97	<i>Azoarvus hutchelli</i>	AJ315676	91
G	SNT3-94	846	3	5.6	<i>Leptothrix</i> sp. MBIC33364	AB015048	93	<i>Leptothrix</i> sp. MBIC33364	AB015048	93

* La identidad solo corresponde a la región alineada.

** Primera secuencia en el BLAST que corresponde a una bacteria descrita.

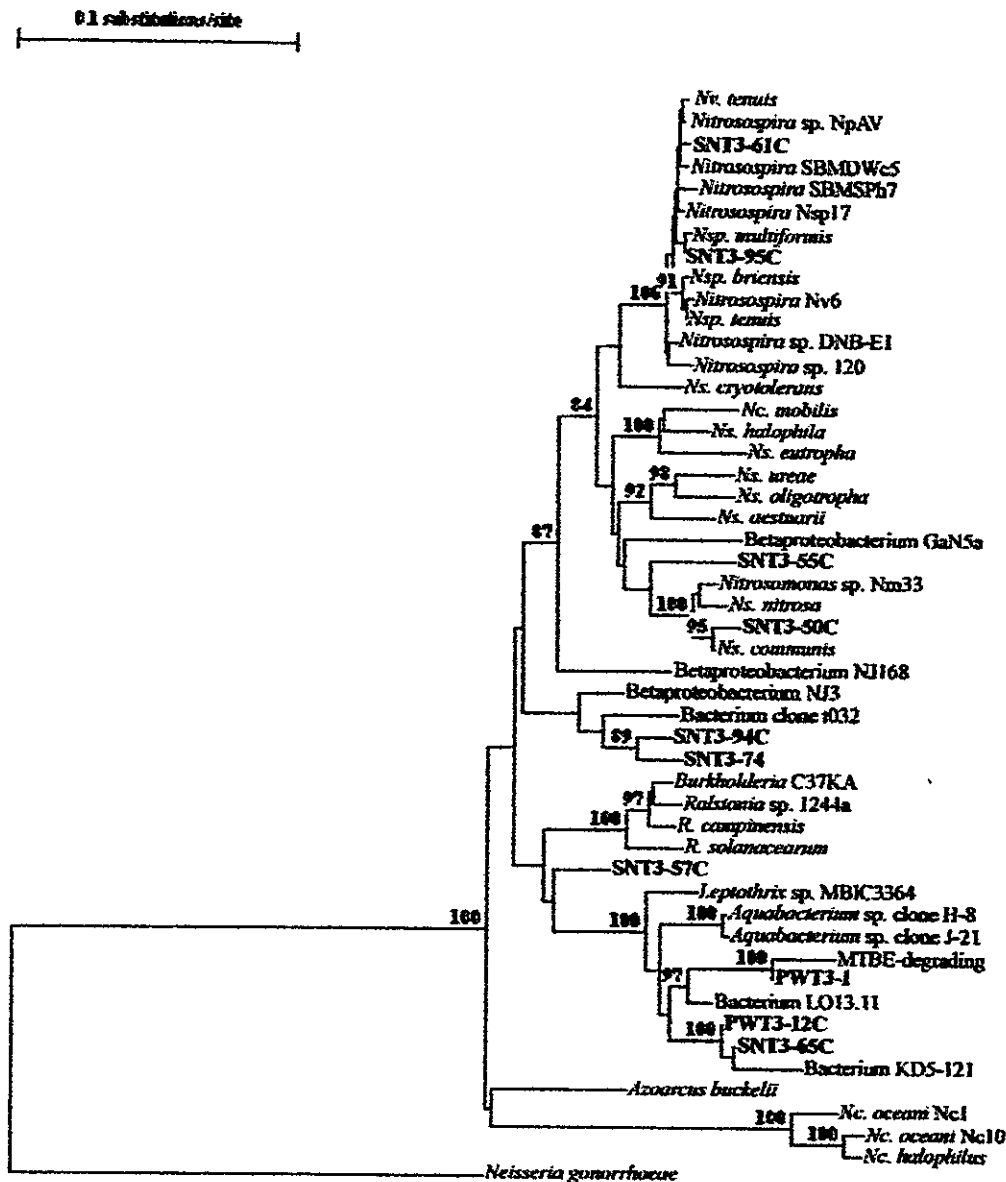


Figura 8.-Dendrograma mostrando las relaciones filogenéticas de las secuencias específicas del 16S rDNA de AOB en suelo. Se usan como referencias secuencias conocidas de AOB y las secuencias más relacionadas según el BLAST. El árbol fue construido usando el método de *Neighbor-joining*. Valores de *bootstrap* mayores al 80% están indicados. Secuencias usadas como referencia: *Nv. tenuis* (AY123803), *Nitrosospiro* sp. NpAV (Y10127), uncultured *Nitrosospiro* clone SBMDWc5 (AY293099), uncultured *Nitrosospiro* clone SBMSP7 (AY293115), *Nitrosospiro* sp. Nsp17 (AY123804), *Nsp. multiformis* (AB070984), *Nsp. briensis* (AJ298741), *Nitrosospiro* sp. Nv6 (AJ298747), *Nsp. tenuis* (AJ298746), *Nitrosospiro* sp. DNB_E1 (AY138531), *Nitrosospiro* sp. N120 (AJ298729), *Ns. cryotolerans* (AJ298730), *Nc. mobilis* (AJ298728), *Ns. halophila* (AJ298731), *Ns. eutropha* (AJ298739), *Ns. ureae* (AJ298730), *Ns. oligotropha* (AJ298736), *Ns. aestuarii* (AJ298734), uncultured beta proteobacterium GaN5a (AJ297417), *Nitrosomonas* sp. Nm33 (AJ298733), *Ns. nitrosa* (AJ298740), *Ns. communis* (F272417), uncultured beta proteobacterium NJ168 (AF351578), uncultured beta proteobacterium NJ3 (AF351571), uncultured bacterium clone t032 (AF422603), *Burkholderia* C37KA (AY005039), *Ralstonia* sp. 1244a (AB054960), *R. campinensis* (AY040355), *R. solanacearum* (AB024609), *Leptothrix* sp. MBIC3364 (AB015048), uncultured *Aquabacterium* sp. clone H-8 (AF523008), uncultured *Aquabacterium* sp. clone J-21 (AF522998), MTBE-degrading bacterium PM1 (AF176594), uncultured bacterium clone LO13.11 (AF358003), uncultured bacterium clone KD5-121 (AY188315), *Azoarcus buckelii* (AJ315676), *Nc. oceani* Nc1 (AJ298727), *Nc. oceani* Nc10 (AJ298726), *Nc. halophilus* (AJ298748). Outgroup: *Neisseria gonorrhoeae* (AF146369). Los clones de este trabajo están indicados en letra con negrilla.

3.4.2.- Análisis de AOB mediante la amplificación del marcador funcional *amoA*.

3.4.2.1.- Análisis bioinformático de las secuencias *amoA*.

La búsqueda específica de secuencias del gen *amoA* disponibles en la red permitió identificar 27 secuencias completas del gen (Tabla 6). Estas secuencias correspondieron a 14 especies de AOB, incluyendo múltiples copias del gen presentes en Beta-AOB. Las secuencias analizadas correspondieron a representantes de los géneros *Nitrosomonas* (7 especies), *Nitrospira* (5 especies, incluyendo *Nitrosolobus multiformes* y *Nv. Temis*) y *Nitrosococcus* (2 especies), pertenecientes a 3 linajes principales de Beta-AOB y las Gamma-AOB, de acuerdo con Purkhold et al. (2003).

Tabla 6.- Secuencias usadas en el análisis de *amoA*. La longitud total de la secuencia y del gen son indicadas en nucleótidos (nt) o aminoácidos (aa).

Cepa	Copia	No. Acceso	Longitud	Tipo	Fuente	Referencia
<i>Nitrosococcus oceanus</i> C-107		U96611	744	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrosococcus oceanus</i> C-107; ATCC 19707		AF047705	744	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrosococcus</i> sp. C-113		AF153344	744	nt	GenBank	Alzateca et al., 1999
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i> ATCC 49181		AF314753	822	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrosomonas europaea</i>		L08050	831	nt	GenBank	McTavish et al., 1993
<i>Nitrosomonas europaea</i>	1	AF058691	831	nt	GenBank	Hommes et al., 1998
<i>Nitrosomonas europaea</i>	2	AF058692	831	nt	GenBank	Hommes et al., 1998
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	1	NT01NE1036	831	nt	TIGR	Chain et al., 2003
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	2	NT01NE2281	831	nt	TIGR	Chain et al., 2003
<i>Nitrosomonas europaea</i> (EC 1.13.12.-)		Q04507	276	aa	Swissprot	Chain et al., 2003
<i>Nitrosomonas eutropha</i> C91; Nm57	1	U51630	831	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrosomonas eutropha</i> C91; Nm57	2	U72670	831	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrosomonas</i> sp. AL212		AF327918	825	nt	GenBank	Suwa et al., 1997
<i>Nitrosomonas</i> sp. GH22		AF327917	831	nt	GenBank	Suwa et al., 1997
<i>Nitrosomonas</i> sp. JL21		AF327919	825	nt	GenBank	Suwa et al., 1997
<i>Nitrosomonas</i> sp. TK794		AB031869	831	nt	GenBank	No publicada
<i>Nitrospira briensis</i> C-128		U76553	825	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrospira</i> sp. AHB1		X90821	681	nt	GenBank	Rotthauwe et al., 1995
<i>Nitrospira</i> sp. Np39-19	1	AF042170	768	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrospira</i> sp. Np39-19	2	AF016002	825	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrospira</i> sp. Np39-19	3	AF006692	825	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrospira</i> sp. NpAV	1	AF032438	825	nt	GenBank	Klotz & Norton, 1995
<i>Nitrospira</i> sp. NpAV	2	AF016003	825	nt	GenBank	Klotz & Norton, 1995
<i>Nitrospira</i> sp. NpAV	3	U92432	825	nt	GenBank	Klotz & Norton, 1995
<i>Nitrosivibrio tenuis</i> NV-12		U76552	825	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrosolobus multiformis</i> Nm24C		AF042171	825	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrosolobus multiformis</i> C-71		X90822	681	nt	GenBank	Rotthauwe et al., 1995
<i>Nitrosolobus multiformis</i> C-71; ATCC 25196	1	U91603	825	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrosolobus multiformis</i> C-71; ATCC 25196	2	U15733	825	nt	GenBank	Norton et al., 2002
<i>Nitrosolobus multiformis</i> C-71; ATCC 25196	3	U89833	825	nt	GenBank	Norton et al., 2002

Debido a que existían incongruencias en la anotación de los partidores publicados para la amplificación por PCR del gen *amoA*, la anotación de los partidores de PCR fue corregida en el alineamiento de las secuencias del gen. Con base en la posición definida en el alineamiento, en este trabajo se propone una nueva nomenclatura de los partidores para los diferentes genes del operón *amo*, en la cual se incluyó el gen blanco, la posición y la orientación (Tabla 7). Una representación esquemática de las regiones donde se localizaron los partidores se presenta en la Figura 9.

3.4.2.1.- Evaluación experimental de los partidores para la amplificación de *amoA*.

La evaluación experimental de los partidores para amplificación de *amoA* fue realizada con el DNA de *Nm. europaea* ATCC 19817. Fragmentos de PCR del tamaño esperado se obtuvieron con las combinaciones de partidores *amoA34f-amoA822r* (789 pb), *amoA332f-amoA822r* (491 pb) y *amoA332f-amoA831r* (500 bp), como se observa en la Figura 10. Las combinaciones de partidores *amoA34f-amoA822r* y *amoA332f-amoA831r* fueron evaluadas en otras cepas de AOB, obteniendo productos de PCR del tamaño esperado en *Nm. marina*, *Nm. eutropha*, *Np. briensis* y *Nv. tenuis* (datos no mostrados).

Dos combinaciones de partidores fueron evaluadas en PCR anidados, para obtener productos de PCR para DGGE. Productos con el tamaño esperado fueron obtenidos con las combinaciones *amoA121fGC-amoA359rC* (240 pb) y *amoA332fGC-amoA822rTC* (491 pb), en las cepas ya mencionadas, así como en *Nc. mobilis* y *Nsl. multiformes*, en los cuales no se había observado producto en la primera reacción (Fig. 11). Con base en estos resultados, los partidores *amoA34f-amoA822r* fueron utilizados para la amplificación en las muestras de suelo.

Tabla 7.- Secuencias de los partidores para *amoA* analizadas en este trabajo. El nombre original del partidor y su posición son indicadas junto con la posición definida en el alineamiento y su nueva designación. Se incluyen los partidores publicados para los genes *amoB* y *amoC*.

Partidor	Nueva designación	Secuencia 5'-3'	Posición	Nueva posición	Organismos de referencia	Tm	Referencia
amoA-1FRol	amoA332f	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	332-349	332-349	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	54.2	Rothlauwe et al., 1997
amoA-2RRol	amoA822r	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	802-822	802-822	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	61.1	Rothlauwe et al., 1997
amoA-1F	amoA34f	GCG GCS AAG ATG CCG CC	282-298	34-50	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	67.6	Este trabajo
amoA-2F	amoA31f	AAR GCG GCS AAG ATG CCG CC	279-298	31-50	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	69.2	Este trabajo
amoA-3Fgo	amoA121f	ACC TAC CAC ATG CAG TT	369-383	121-137	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	48	Este trabajo
amoA-4Rg	amoA359c	GCG TAG TCG GAC CAC CAG TA	588-607	340-359	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	60.8	Este trabajo
amoA-5R	amoA831r	TTA TTT TAT CCC CTC	1063-1079	817-831	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	38.1	Este trabajo
amoA-6R	amoA144f	TTA TTT TAT CCC CTC BGS AAA	1059-1079	811-831	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	53.3	Este trabajo
amoA-Hol	amoA576f	GAC TGG GAC TTC TGG	402-416	144-168	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	44.6	Este trabajo
amoA-3FPur	amoA295f	GGT GAG TGG GYT AAC MG	576-597	577-596	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	54.5	Este trabajo
A189	amoA141f	GON GAC TGG GAC TTC TGG	295-310	295-311	<i>Nitrosococcus oceanus</i> (AF047705)	46.1	Purkhold et al., 2000
A682	amoA681f	GAA SGC NGA GAA GAA SGC	802-820	664-681	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	55.8	Holmes et al., 1995
AmoA-2R'	amoA820r	CCT CKG SAA AGC CTT CTT C	802-820	802-820	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	45.2	Holmes et al., 1995
A337	amoA337p	TTC TAC TGG TGG TCR CAC TAC CCC ATC AAC T	337-367	337-367	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	52.8	Okano et al., 2004
amoA-2R-TG	amoA822HG	CCC CTC TGG AAA GCC TTC TTC	800-820	802-822	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	70.8	Okano et al., 2004
amoA-2R-TC	amoA822TC	CCC CTC TGC AAA GCC TTC TTC	800-820	802-822	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	63.5	Okano et al., 2004
amoA1Frot mod	amoA332HfY	GGG GHT TTT ACT GGT GGT	332-349	332-349	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	64.6	Nicolaisen & Ramsing, 2002
amoAF	amoA21f	AGA AAT CCT GAA AGC GGC	269-286	21-38	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	50.1	Stephen et al., 1999
amoAR	amoA686r	GAT ACG AAC GCA GAG AAG	917-934	669-686	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	57.7	Singalilano et al., 1995
amoA-1FF	amoA187f	CAA TGG TGG CCG GTT GT	187-203	187-203	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	51.1	Singalilano et al., 1995
A682 mod	amoA680r	AAV GCV GAG AAG AA'W GC	288-305	664-680	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	61.2	Hoshino et al., 2001
AMO-F2	amoA40f	AAG ATG CCG CCG GAA GC	895-913	40-56	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	64.7	Juretschko et al., 1998
AMO-R2	amoA665f	GCT GCA ATA ACT GTG GTA	1436-1461	648-665	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	49.6	Juretschko et al., 1998
301F	amoA154f	TAT GAT CCC CTC TGG AAA GCC TTC TTC	2084-2110	154-179	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	71.7	Norton et al., 2002
304R	amoA54r	TAY CCG TTC CCG CCG GAT TTT CCG CCG	1316-1342	82-828	<i>Nitrosomonas europaea</i> (L08050)	70.1	Norton et al., 2002
308R	amoB306r	TCC CAG CTK CCG GTR ATG TTC ATC C	2579-2603	28-54	<i>Nitrosospira Np39-19</i> (AF042170)	82.3	Norton et al., 2002
amoBMf	amoB160f	TGG TAY GAC ATK AWA TGG	160-177	482-506	<i>Nitrosomonas europaea</i> (NE0943)	68.5	Norton et al., 2002
amoBMr	amoB660r	RCQ SGG CAR GAA CAT SGG	649-660	160-177	<i>Nitrosomonas europaea</i> (NE0943)	36.1	Calvo & Garcia-Gil, 2004
amoB-4R	amoB44r	GCT AGC CAC TTT CTG G	30-44	39-44	<i>Nitrosomonas europaea</i> (NE0943)	52.1	Calvo & Garcia-Gil, 2004
305F	amoC763f	GTG GTT TGG AAC RGI CAR AGC AAA	1012-1035	763-786	<i>Nitrosococcus oceanus</i> (AF047705)	48.7	Purkhold et al., 2000
					<i>Nitrosomonas europaea</i> (NTOJNE1037)	63.4	Norton et al., 2002

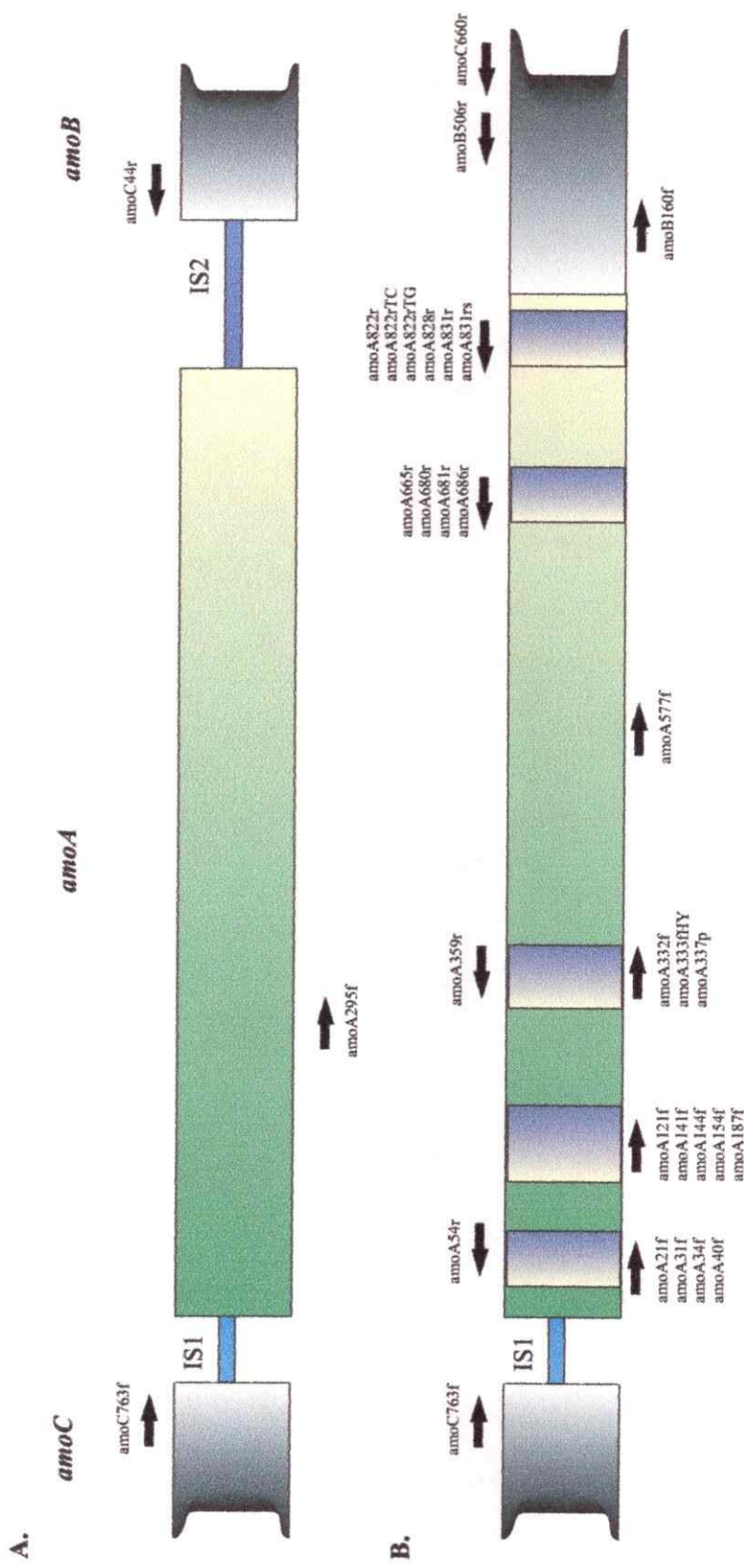


Figura 9.- Representación esquemática de los operones *amoCAB* en bacterias oxidadoras de amonio (AOB). A. Estructura del operón en Gamma-AOB. B. Estructura del operón en Beta-AOB. las regiones intergénicas (*IS*) están indicadas. En el gen *amoA* las regiones de localización de los partidores (en color morado) y su orientación son indicadas por flechas (para los detalles ver Tabla 7).

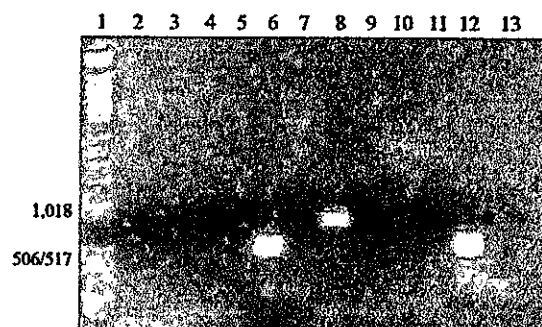


Figura 10.- Amplificación del gen *amoA* en *Nm. europaea* ATCC 19817 (carriles pares). Los controles de PCR se presentan en los carriles impares. 1. Marcador de peso molecular. 2-3. *amoA34f-amoA831r*; 4-5. *amoA31f-amoA831rs*; 6-7. *amoA332f-amoA831rs*; 8-9. *amoA34f-amoA822r*; 10-11. *amoA31f-amoA822r*; 12-13. *amoA332f-amoA822r*.

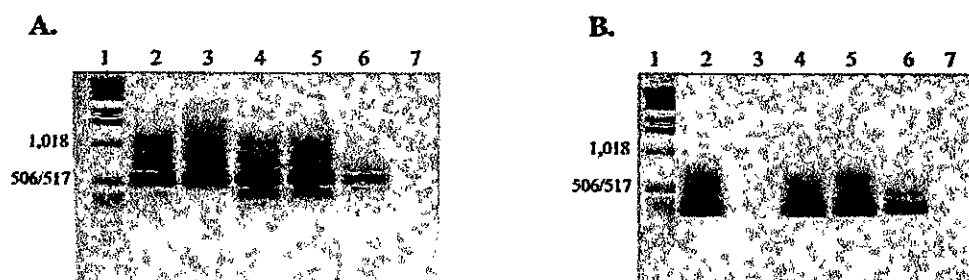


Figura 11.- Amplificación del gen *amoA* con los partidores para DGGE. A. *amoA332fGC-amoA822rTC*. B. *amoA121fGC-amoA359rC*. 1. Marcador de peso molecular; 2. *Nm. europaea* ATCC 19817; 3. *Nm. eutroph*; 4. *Np. briensis* Valois 128; 5. *Nv. tenuis* Stl1; 6. *Nsl. multiformes* Valois 5; 7. Control.

3.4.2.3.- Cambios en la composición de AOB en el suelo analizados con el marcador *amoA*.

Las diferencias en la composición del gremio de AOB en el suelo en presencia o no de la planta leguminosa fueron evaluadas usando el marcador funcional *amoA*. En el suelo se obtuvieron productos de PCR con los partidores para DGGE *amoA121fGC-amoA369rC* en un conjunto de las muestras, correspondientes principalmente a suelo tratado con los

tratamientos de riego sin la adición de nitrato (H y W), independientemente de la presencia de la planta. En las muestras regadas con la solución de Hoagland con nitrato (tratamiento N) sólo se obtuvo amplicones en el tiempo T1 (Fig. 12A). Los patrones de DGGE de *amoA* en las muestras amplificadas mostraron poca variación entre los tratamientos (Fig. 12B). Según su migración, los amplicones se relacionan con secuencias del grupo de *Nitrosospira* mas que con secuencias del grupo de *Nitrosomonas*.

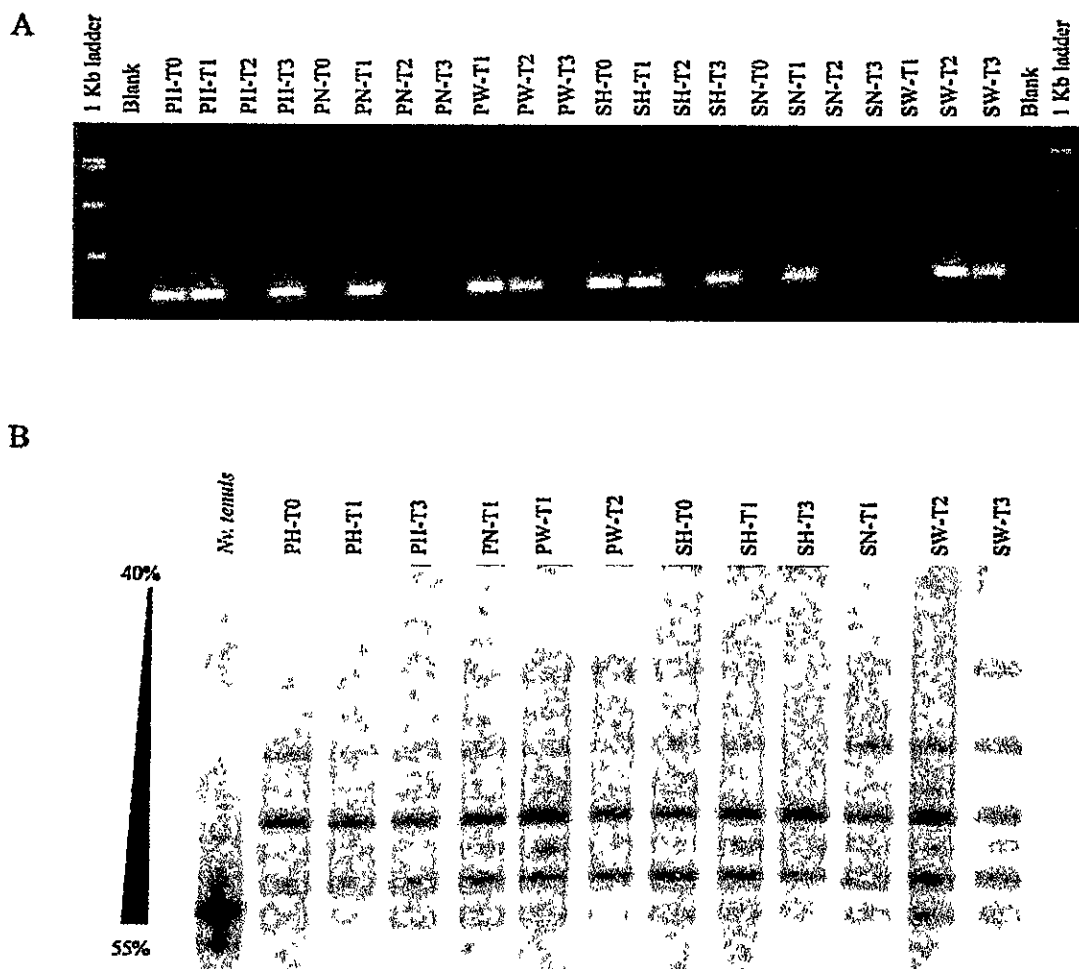


Figura 12.- Análisis de la composición del gremio de AOB usando el marcador funcional *amoA*. A. Gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con los primarios *amoA*122fGC-*amoA*360rC. B. DGGE de las muestras amplificadas.

Los productos de PCR del gen *amoA* de la muestra PWT1 fueron clonados y secuenciados. De acuerdo con los resultados obtenidos en el DGGE, la diversidad de las secuencias de los clones fue baja y la identificación de éstas por BLAST mostró alta similitud con secuencias de los géneros *Nitrosospira* y *Nitrosolobus*, confirmando las observaciones basadas en la movilidad en el gradiente desnaturalizante (Tabla 8).

Las secuencias de *amoA* de los clones fueron comparadas con secuencias de referencia del gen *amoA* disponibles en la base de datos (Fig. 13). Como se esperaba de los resultados obtenidos en la búsqueda mediante el programa BLASTN, las secuencias obtenidas en este trabajo se agruparon con secuencias correspondientes al linaje de *Nitrosospira*, así como con secuencias del gen *amoA* de clones correspondientes a bacterias oxidadoras del amonio no cultivadas.

Tabla 8.- Identificación de los clones de *amoA*.

Clon	Long (pb)	No. clones	Secuencia más relacionada	Identidad %*	Secuencia adscrita a una bacteria descrita**
PWT1-64	492	18	Uncultured soil bacterium SC-MGR-P1K20	98	<i>Nitrosospira</i> sp. Nsp17
PWT1-61	494	7	Uncultured soil bacterium SC-MGR-P1K02	98	<i>Nitrosospira</i> sp. Nsp17
PWT1-70	294	1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium KMS137c1	98	<i>Nitrosolobus multiformis</i>
PWT1-82	435	2	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium KMS137c5	97	<i>Nitrosolobus multiformis</i>
PWT1-67	493	18	Uncultured soil bacterium SC-MGR-P1K20	96	<i>Nitrosospira</i> sp. Nsp17

*La identidad solo corresponde a la región alineada.

** Primera secuencia en el BLAST que corresponde a una bacteria descrita.

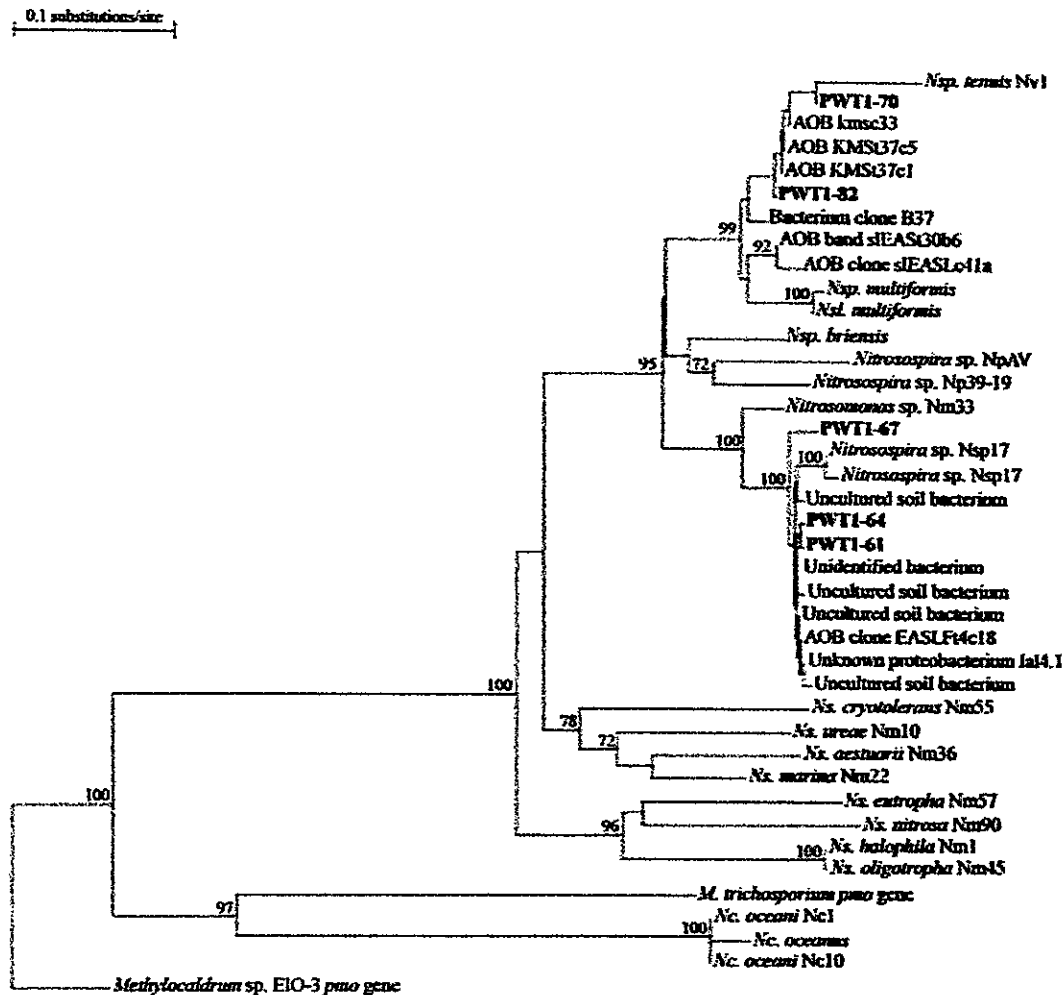


Figura 13.- Dendrograma mostrando la relación de las secuencias de *amoA* en el suelo. Se usan secuencias de referencia de AOB y las secuencias más relacionadas según los resultados de BLAST. El árbol fue construido usando el método de *Neighbor-joining*. Solo valores de *bootstrap* mayores que 70% están indicados. Secuencias de referencia: *Nsp. tenuis* Nv1 (AJ298720), uncultured ammonia-oxidizing bacterium kmsc33 (AY249653), uncultured ammonia-oxidizing bacterium KMS37c5 (AY249667), uncultured ammonia-oxidizing bacterium KMS37c1 (AY249666), uncultured bacterium clone B37 (AY050674), uncultured ammonia-oxidizing bacterium band sIEAS30b6 (AY177943), uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone sIEASLc41a (AY177929), *Nsp. multiformis* (AY177933), *Nsl. multiformis* (U15733), *Nsp. briensis* (U76553), *Nitrosospira* sp. NpAV (AF032438), *Nitrosospira* sp. Np39-19 (AF042170), *Nitrosomonas* sp. Nm33 (AJ298706), *Nitrosospira* sp. Nsp17 (AY123825 y AJ298717), uncultured soil bacterium (AJ537566), unidentified bacterium (Z97841), uncultured soil bacterium (AJ537568), uncultured soil bacterium (AJ537557), uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone EASLFt4c18 (AY177965), unknown proteobacterium clone IaI4.1 (AJ388583), uncultured soil bacterium (AJ538159), *Ns. cryotolerans* Nm55 (AJ298712), *Ns. ureae* Nm10 (AJ388585), *Ns. aestuarii* Nm36 (AJ298707), *Ns. marina* Nm22 (AJ388587), *Ns. eutropha* Nm57 (AJ298713), *Ns. nitrosa* Nm90 (AJ298714), *Ns. halophila* Nm1 (AJ238541), *Ns. oligotropha* Nm45 (AJ298709), *M. trichosporium pmo* gene (U31650), *Nc. oceani* Nc1 (AJ298700), *Nc. oceanus* (AF047705), *Nc. oceani* Nc10 (AJ298699). Outgroup: *Methylocaldrum* sp. EIO-3 pmo gene (AJ544091). Los clones de este trabajo están indicados en letra con negrilla.

3.5.- Composición y función del gremio de bacterias desnitrificantes.

3.5.1.- Tasas de actividad de desnitrificación en suelo.

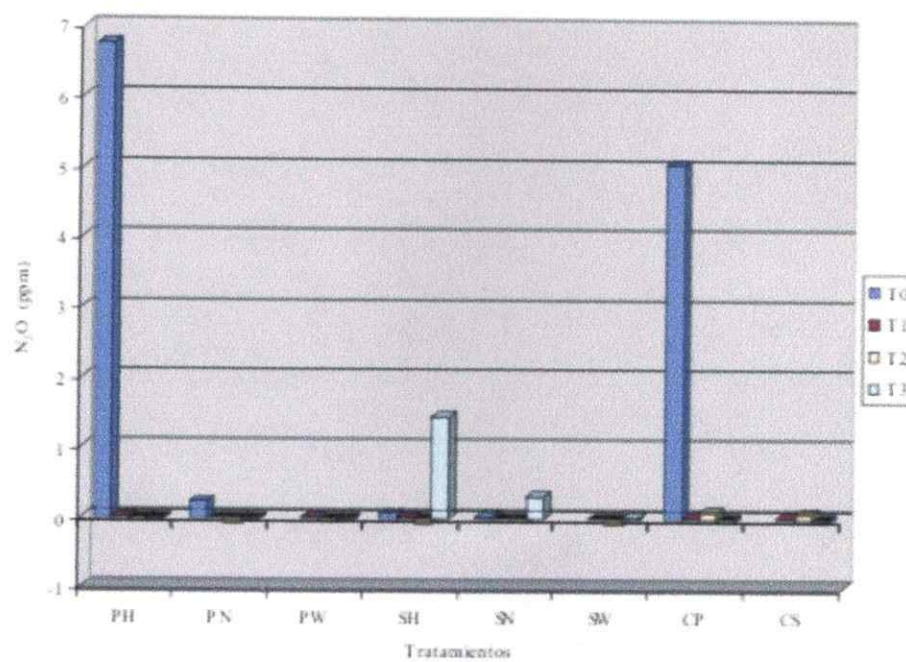
La actividad de las bacterias desnitrificantes en suelo plantado con *P. vulgaris* y en suelo sin plantar fue determinada después de 6 h de incubación en presencia de acetileno (Fig. 14). Las tasas de desnitrificación más altas se observaron en el tiempo T0 (3 días después de la siembra de las semillas). Asimismo, diferencias importantes en las tasas de desnitrificación fueron obtenidas en el muestreo T3, en donde la actividad desnitrificante en el suelo sin plantar coincide con el incremento del nitrógeno disponible en el suelo (ver Tabla 3).

Los resultados obtenidos en el muestreo T2 requieren una explicación adicional debido a que la producción de N_2O en las muestras control (sin la adición de acetileno) indica actividad de las bacterias desnitrificantes en el suelo, así como de otros microorganismos involucrados con la producción de este compuesto como las bacterias nitrificantes. Sin embargo, las muestras tratadas con acetileno producen valores negativos, los cuales coinciden con valores significativos de fijación de nitrógeno en el suelo que pueden alterar la eficiencia del ensayo de bloqueo.

3.5.2.- Análisis del marcador *nirK* en cultivos puros y en muestras de suelo por DGGE.

El DNA de bacterias desnitrificantes fue usado como templado para la obtención de productos para DGGE. Productos del tamaño esperados (450 pb) fueron obtenidos en las bacterias *A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DSM 30026, *Ochrobactrum anthropi* LMG 2136 y *Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015 (Fig. 15).

A.



B.

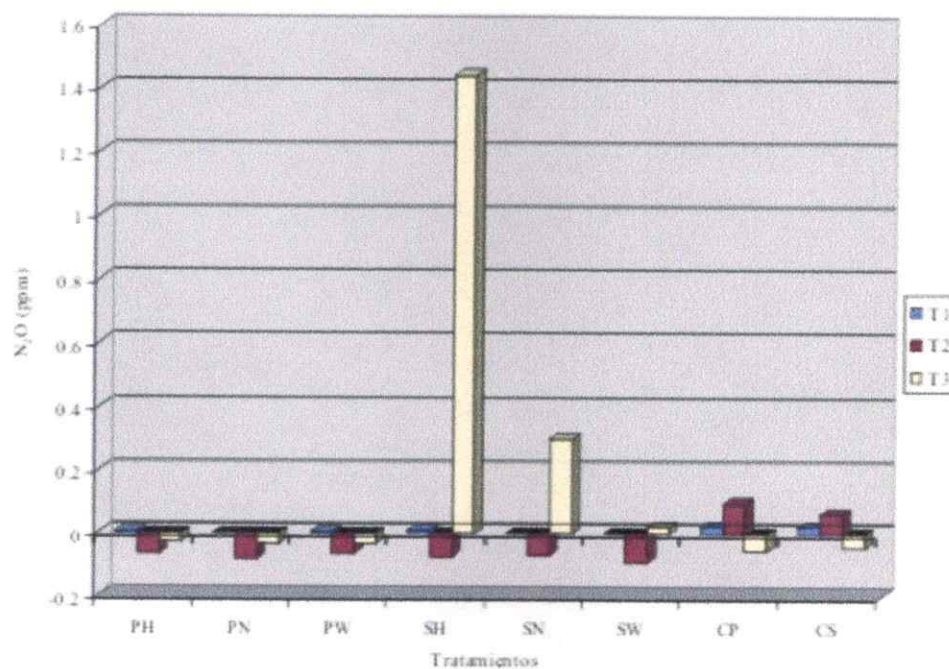


Figura 14.- Tasa de desnitrificación en el suelo. Las medidas se basan en la acumulación de óxido nítrico después de 6 h de incubación. A. Todos los tiempos considerados. B. El tiempo T0 fue omitido.

Los ensayos de PCR para el análisis de DGGE fueron realizados también en *Nm. europaea* ATCC 19817, en donde se encuentra reportada la presencia del gen *nirK* (Chain et al., 2003). Sin embargo, los productos de PCR obtenidos con ambos partidores tuvieron un tamaño diferente al esperado, que correspondió a un amplificado inespecífico (Fig. 15).

Con el fin de establecer las condiciones adecuadas para el análisis de DGGE los amplicones de las cepas estándar fueron evaluados en geles en gradiente perpendicular para establecer el gradiente de desnaturalización. El producto de *O. antrophii* se desnaturalizó sobre una concentración del 60%, mientras que los productos de *A. xylosoxidans* y *A. denitrificans* se desnaturalizaron a concentraciones cercana al 70% (Fig. 16A). Con base en los resultados, el gradiente seleccionado para los experimentos fue de 30-80%.

Posteriormente, se realizó un experimento denominado de *time travel* para determinar el tiempo óptimo de separación de los fragmentos, que correspondió a 10 h (Fig. 16B). Sin embargo, bajo las condiciones analizadas no fue posible eliminar la interferencia de artefactos del PCR en el resultado final (Fig. 16B).

Diferentes condiciones de PCR fueron ensayadas para la obtención de productos de PCR del gen *nirK* unidos a *GC-clamp* en las muestras de suelo. Un producto del tamaño esperado fue obtenido en todas las muestras (datos no mostrados) pero el análisis de este producto en un gel de DGGE mostró la presencia de bandas detenidas en el gradiente sólo en algunas muestras de suelo y la presencia del artefacto de PCR previamente observado en los estándares (Fig. 17).

Pasos adicionales de limpieza del templado para el PCR anidado, así como ensayos de amplificación directa con los partidores unidos a la *GC-clamp* fueron evaluados, pero en ambos casos no fue posible obtener productos de PCR para DGGE en las muestras de suelo.

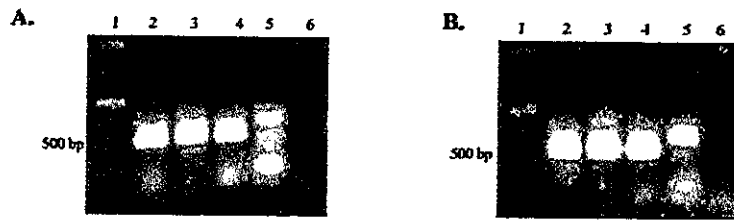


Figura 15.- Amplificación del gen *nirK* en cepas estándar *A. denitrificans* (línea 2), *O. antrophi* (línea 3), *A. xylooxidans* (línea 4), y *Nm. europaea* (línea 5). Línea 1= marcador de peso molecular; línea 6= Control. A. *nirK1FGC*. B. *nirK5RGC*.

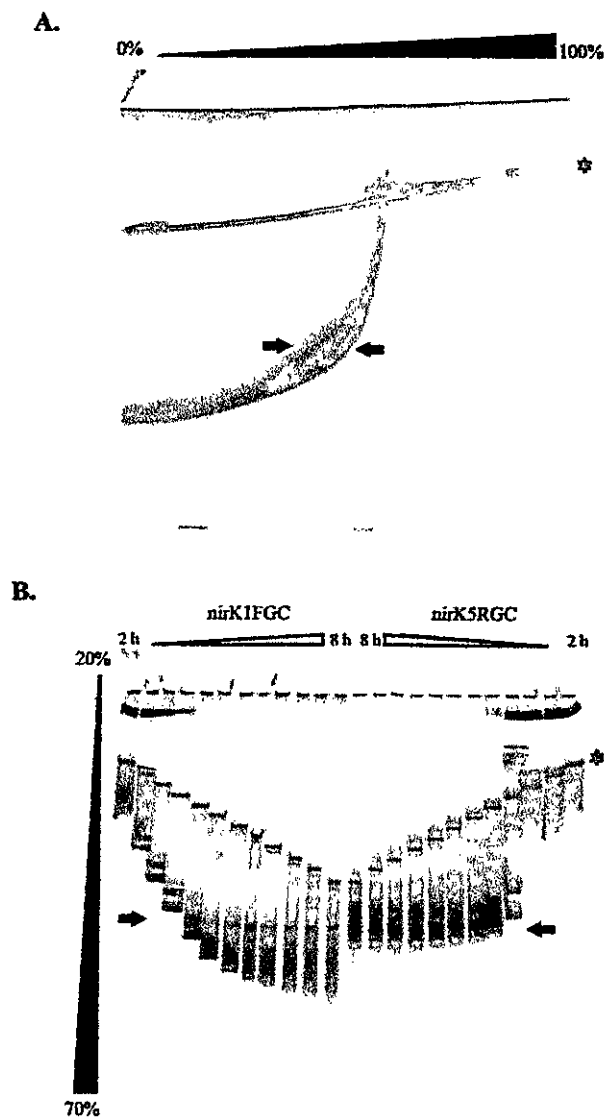


Figura 16.- Estandarización del análisis de DGGE para los productos de PCR de *nirK* de *O. antrophi*. A. Gel en gradiente perpendicular con el producto de *nirK1FGC*. B. Experimento de *time travel* para los productos de PCR obtenidos con ambos partidores unidos a la *GC-clam*. Las flechas indican las bandas analizadas. Las estrellas señalan DNA de hebra simple.

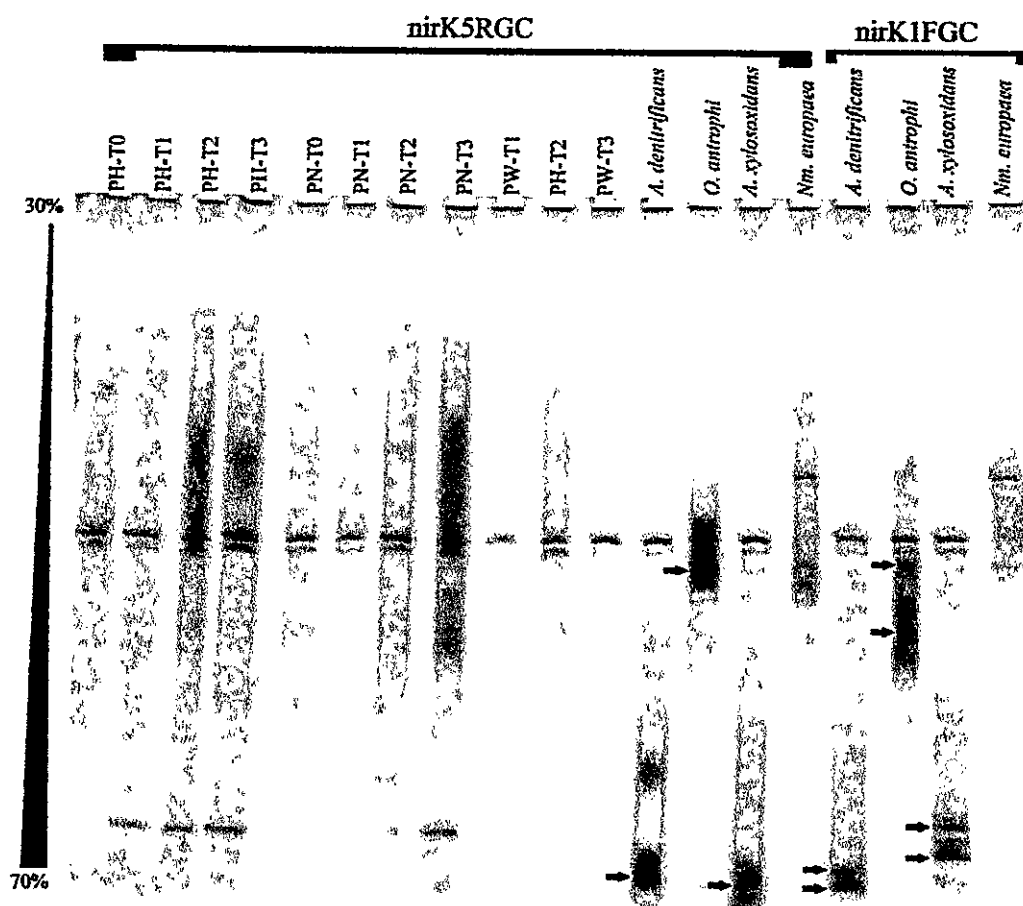


Figura 17.- Análisis del marcador *nirK* por DGGE en las muestras de suelo y los estándares. Las flechas indican las bandas analizadas en los estándares. La estrella señala artefactos de PCR. En el PCR realizado con el partidor nirK1FGC se observan dos bandas en el gel debido a posiciones degeneradas en el partidor reverso.

3.5.3.- Análisis de la composición de bacterias desnitrificantes por T-RFLP.

La diversidad de bacterias desnitrificantes en muestras ambientales ha sido determinada previamente mediante el análisis del gen *nirK* por T-RFLP (Avrahami et al., 2002). Inicialmente, se comparó el tamaño de los fragmentos terminales (T-RFs) obtenidos para los estándares utilizados en el análisis de DGGE. Un alineamiento de las secuencias específicas de *nirK* para estas cepas y otras secuencias de *Ochrobactrum* disponibles en la

base de datos permitió estimar los posibles sitios de restricción. El tamaño de los T-RFs esperados y observados para cada secuencia se resume en la Tabla 9. Sólo en el caso de *A. xyloxydans* las diferencias entre el T-RF esperado y el observado se encuentran dentro de la desviación experimental de la técnica (Clement et al., 1998; Lueders & Friedrich, 2003). En los otros casos los resultados experimentales no coinciden con el análisis bioinformático. En el caso de las muestras de suelo sólo un conjunto limitado de muestras fueron amplificadas con el partidor marcado. Dada la baja representación de estos resultados, no se realizó ninguna comparación de los mismos.

Tabla 9.- Comparación de la longitud de los fragmentos terminales (T-RFs) para las especies conocidas de bacterias desnitrificantes. Digestiones realizadas con la enzima *HaeIII*. Los T-RFs están expresados en pb.

Especie	T-RF esperado	T-RF observado	Diferencia
<i>A. denitrificans</i>	65	143	78
<i>A. xyloxydans</i>	65	68	3
<i>O. antrophi</i>	277	178	99

3.5.4.- Análisis bioinformático de la secuencia del gen *nirK*.

Considerando todos los inconvenientes experimentales observados para la amplificación de *nirK* en las muestras de suelo, se realizó un análisis bioinformático de las regiones blanco de los partidores específicos para la amplificación de los genes de las nitrato reductasas (Braker et al., 1998; Hallin & Lideren, 1999; Michotey et al., 2000). La Figura 18 muestra el alineamiento de la región correspondiente al partidor *nirK1F*, en donde se observó que no existe suficiente conservación de la secuencia para que dicho partidor pueda ser considerado como universal para el estudio de las bacterias desnitrificantes.

Por ejemplo, en el caso de los géneros *Nitrosomonas* y *Bradyrhizobium*, se observaron inserciones que impedirían la amplificación del gen *nirK* estas bacterias. Experimentalmente, se evaluó la amplificación de *nirK* en diferentes bacterias rizobiales en las cuales no fue posible obtener producto de PCR, confirmando los resultados obtenidos en el análisis bioinformático. Este análisis explicaría también los resultados previamente descritos para *Ns. europaea* en donde se obtuvo un amplificado inespecífico.

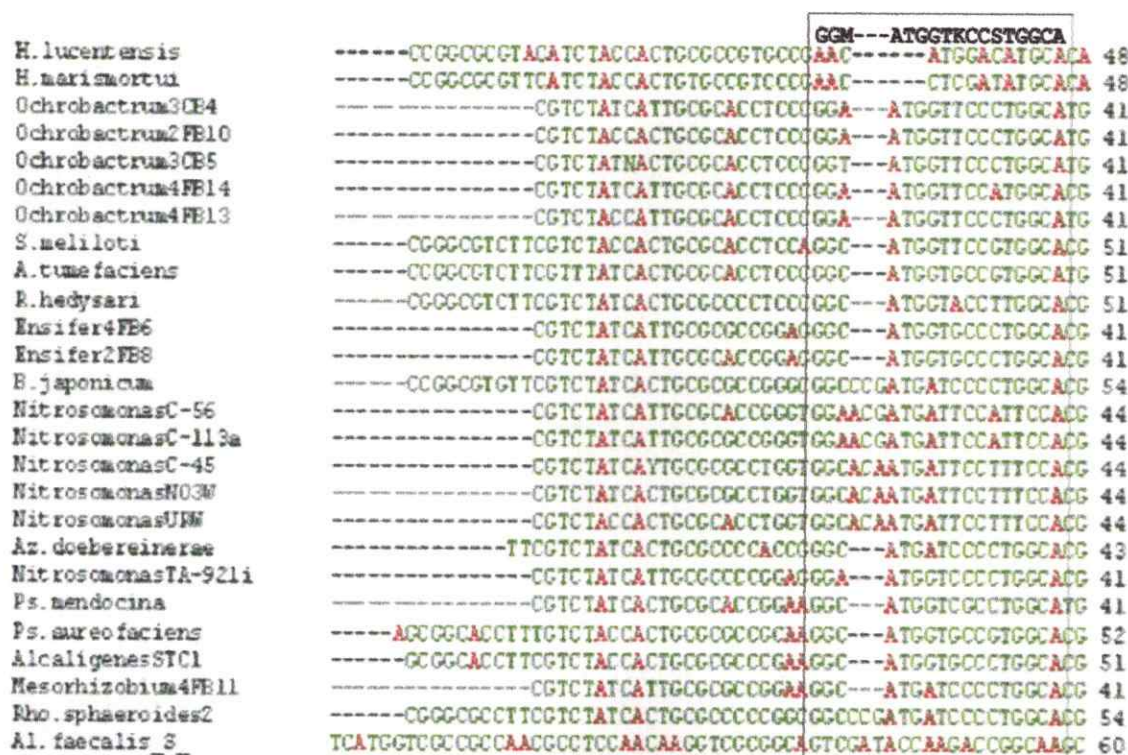


Figura 18.- Alineamiento múltiple de diferentes secuencias de *nirK*. Se muestra la región blanco del partidor *nirK1F* (5'-GGMATGGTKCCSTGGCA-3'). La secuencia de *Al. faecalis* corresponde al gen de la nitrito reductasa no relacionada *nirS*. El asterisco indica posiciones conservadas completamente en el alineamiento. Las adeninas están señaladas en rojo.

3.6.- Composición y función del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofos).

3.6.1.- Tasas de fijación de nitrógeno en el suelo.

Las tasas de fijación de nitrógeno en el suelo fueron determinadas en el suelo plantado y sin plantar para cada tiempo de muestreo. Sin embargo sólo se obtuvo fijación de nitrógeno en suelo en el tiempo T2 (40 días después de la siembra) donde las plantas se encontraban en estado de floración y fructificación (Fig. 19). La tasa de producción de etileno en las muestras de suelo con plantas comparada con su respectivo suelo control (CP), fue en la mayoría de los casos despreciable. Por el contrario, en los tratamientos de suelo sin plantar la tasa de fijación de nitrógeno fue significativas con relación a la muestra control (CS), indicando que la actividad de las bacterias diazótrofes está afectada por la presencia de la planta leguminosa.

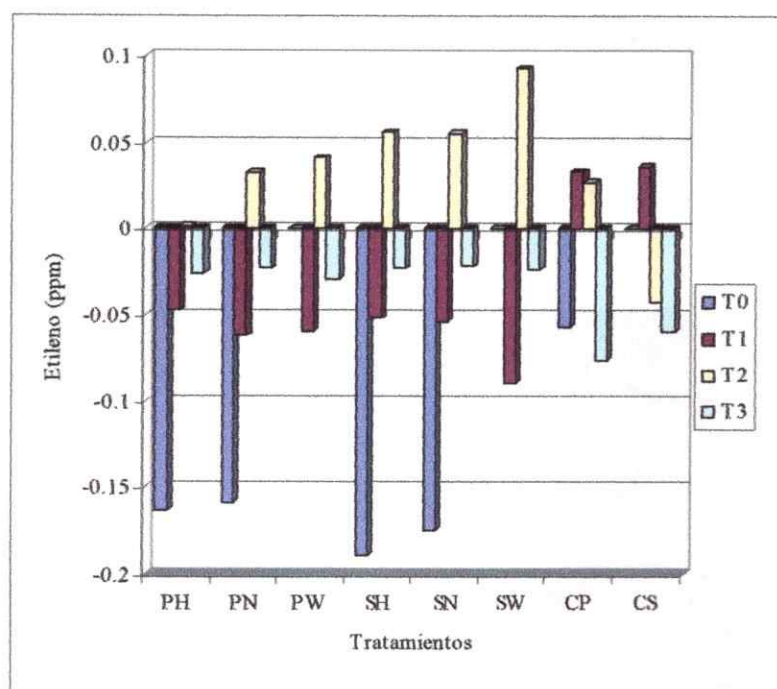


Figura 19.- Tasas de fijación de nitrógeno en los diferentes tratamientos. CP= muestra control tratamientos plantados. CS= muestra control de suelo sin plantar.

3.6.2.- Estandarización del análisis de T-RFLP para el estudio de las comunidades de diazótrofos en el suelo.

3.6.2.1.- Evaluación de la reproducibilidad del análisis de T-RFLP.

Con el fin de determinar la desviación experimental de los parámetros obtenidos en el análisis de T-RFLP (tamaño, altura y área del *peak*), se comparó la diferencia de los resultados generados de la integración de los datos obtenidos en dos determinaciones independientes (Tabla 10). Las diferencias observadas en el tamaño del *peak* fueron en promedio inferiores al 1% y dicha desviación no se correlacionó con el tamaño del fragmento analizado. Asimismo, estos valores no cambiaron significativamente cuando se compararon de forma independiente los resultados de DNA de cultivos puros y de DNA de nódulo de rizobia y DNA de suelo.

Las diferencias en la altura y el área del *peak* fueron más pronunciadas que en el caso anterior, siendo en promedio 10 y 7%, respectivamente (Tabla 10). Estos valores tampoco estuvieron correlacionados con el tamaño del fragmento. Considerando la desviación experimental observada, en el análisis de las muestras de suelo la definición de un *peak* común entre muestras diferentes cuando grupos de *peaks* de tamaños similares fueron analizados, se estableció con base en el criterio de 1% de desviación alrededor de un valor medio.

Adicionalmente, se observó la aparición de fragmentos entre 35 y 50 bp en una sola réplica experimental y por consiguiente, en los resultados obtenidos en este trabajo se omitieron los T-RFs dentro de este rango de tamaños dada su baja reproducibilidad.

Tabla 10.- Determinación del porcentaje de desviación experimental del análisis de *nifH* por T-RFLP. Comparación de las determinaciones del tamaño, altura o área de los T-RFs de *nifH* obtenidos en dos experimentos independientes tanto en cultivos puros (*R. tropici* CIAT899, *R. meliloti* CIAT44 y *B. japonicum* USDA110), como en muestras ambientales (nódulo rizobial N213 y muestra de suelo PHT2). La determinación incluye los datos de la digestión con 3 enzimas de restricción diferentes (*Hae*III, *Msp*I y *Mbo*I) y ambos partidores marcados.

	Desviación promedio	Coefficiente de correlación	<i>R. tropici</i> CIAT899	<i>R. meliloti</i> CIAT44	<i>B. japonicum</i> USDA110	Nódulo rizobial N213	Suelo (PHT2)
Tamaño del <i>peak</i> (pb)	0.70	-0.07	0.37	0.24	1.34	1.39	0.74
Altura del <i>peak</i> (UF)	10.68	0.16	18.12	13.47	6.58	6.83	6.09
Área del <i>peak</i> (UF)	7.48	0.53	9.61	6.66	9.23	8.91	4.92
Bandas comparadas	75	—	9	24	8	12	12

3.6.2.2.- Simulación de una comunidad de diazótrofos.

Con el fin de determinar si la frecuencia de un blanco particular se ve reflejada con exactitud en la frecuencia de los T-RFs obtenidos, en este trabajo se analizó una mezcla de diferentes diazótrofos (comunidad simulada). Los productos de PCR de 3 bacterias rizobiales (*R. meliloti* CIAT44, *R. tropici* CIAT899 y *B. japonicum* USDA110) y de *Acidithiobacillus ferrooxidans* fueron amplificados a diferentes concentraciones con los partidores marcados y posteriormente fueron digeridos con *Hae*III. Después de la normalización de los resultados se determinó los T-RFs específicos para cada una de las cepas. Sin embargo, en todos los casos se observaron algunos *peaks* secundarios con UF sobre el valor umbral analizado (5 UF) que correspondieron a productos de digestiones parciales, como fue verificado a partir de la predicción bioinformática de los patrones de digestión. Estas digestiones parciales representaron en promedio el 5% del DNA analizado en cada muestra.

Los productos marcados a partir de las mezclas conocidos se prepararon con diferentes concentraciones de templado diluido en series de 10 (1 a 0.001 ng). En general se observó que la señal de las muestras diluidas 100 o 1000 veces en el PCR se pierde en los perfiles de T-RFs finales y por ende, las comparaciones realizadas fueron limitadas a las diluciones 1 a 0.1 (relación esperada de 10 veces). En la Tabla 11A se presentan los resultados de las comparaciones realizadas. En los resultados se observa que no existe correlación entre las razones esperadas y los valores obtenidos experimentalmente, presentándose diferencias importantes en la eficiencia de amplificación entre las especies analizadas. Por ejemplo, en aquellas muestras en donde *B. japonicum* fue adicionada como el templado no diluido (1 ng), no se observó la amplificación de las otras especies analizadas. Resultados contrarios se obtienen en el caso de *A. ferrooxidans*, en donde se tiene señal de amplificación incluso en la muestra diluida 100 veces (*R. tropici* 0.01 ng de DNA; Tabla 11A).

Tabla 11.- Desviación de la razón templado/producto en el PCR obtenidas para una mezcla conocida de templados. La razón fue calculada en UF. Las muestras 1 y 2 indican las especies comparadas. * *A. ferrooxidans* no fue amplificado. ** Comparación de templados 1 ng a 0.01 ng. A. Experimento en presencia o no de DNA competidor. B. Comparación realizada únicamente cuando se adicionó DNA de N213 como competidor.

A.		Muestra1 (1 ng)/ Muestra2 (0.1 ng)	<i>R. meliloti</i>	<i>A. ferrooxidans</i>	<i>A. ferrooxidans</i> **	<i>R. tropici</i>
			<i>R. tropici</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>R. tropici</i> **	<i>B. japonicum</i>
DNA competidor	Sin DNA	Esperado	10	10	100	10
		Observado	1.45	2.3	4.42	2.97
	N213 (nódulo)	Esperado	10	10	100	10
		Observado	1.36	*	*	3.18
	PHT2 (suelo)	Esperado	10	10	100	10
		Observado	1.18	2.61	0.74	6.14

B.		Muestra1 (1 ng)/ Muestra2 (0.1 ng)	<i>R. meliloti</i>	<i>R. tropici</i>	<i>B. japonicum</i>
			N213	N213	N213
		Esperado	1	1	1
		Observado	0.87	1	1.84

Las mismas combinaciones de templados fueron amplificadas junto con DNA de muestras ambientales como competidor. En este caso se empleó DNA de un nódulo rizobial (N213) y DNA de suelo (PHT2), adicionados en una concentración de 1 ng (Tabla 11A). En general se observó que en presencia del inhibidor se mantuvieron las razones previamente establecidas, pero en el caso de *A. ferrooxidans* la competencia con DNA de nódulo elimina la amplificación de esta bacteria.

Cuando se comparó las razones 1:1 entre DNA de nódulo y las tres bacterias rizobiales, las razones observadas fueron similares a los valores esperados teóricamente (Tabla 11B). Estos resultados indican por lo tanto que el análisis de T-RFLP es cuantitativo sólo cuando se comparan blancos relacionados presentes en las muestras a concentraciones equivalentes.

3.6.3.- Cambios en la composición de los ensambles de diazótrofos en el suelo.

Los datos de T-RFLP de las muestras de suelo fueron generados con cuatro digestiones. El número de T-RFs obtenidos en cada digestión varió con las diferentes enzimas de restricción y el partidor marcado (Tabla 12). El número más alto de T-RFs fue obtenido con la enzima *MspI* y el partidor *forward* marcado, mientras que la doble digestión *HaeIII/MspI* con el partidor *reverse* marcado produjo el menor número de T-RFs.

Tabla 12.- Número de fragmentos terminales (T-RFs) analizados para cada digestión de *nifH*. N.D.= no determinado.

Enzima	Forward	Reverse	Total
<i>HaeIII</i>	28	N.D.	28
<i>HaeIII/MspI</i>	28	6	34
<i>MboI</i>	35	38	73
<i>MspI</i>	49	28	77

Dado que los resultados de las comunidades simuladas no apoyaron la comparación cuantitativa de los datos de T-RFLP, el análisis en las muestras de suelo fue cualitativo. El número total de T-RFs en las muestras no se correlacionó con los tratamientos analizados, variando entre 58 y 101 T-RFs. Por el contrario, el análisis de los cambios en la composición de diazótrofos mostró una tendencia general al agrupamiento de las muestras de acuerdo con la presencia o no de la planta leguminosa. Esta tendencia fue representada por la separación de las muestras de suelo con o sin plantas en dos grupos, resultado que se obtuvo tanto en el análisis de agrupamiento como en el análisis de componentes principales PCA (Fig. 20).

No se observó el efecto de los tratamientos de irrigación sobre los cambios en la composición de diazótrofos en las muestras de suelo plantado con *P. vulgaris*. Por el contrario en las muestras de suelo sin plantar, existe un agrupamiento de las muestras de acuerdo con los tratamientos de irrigación, en donde las muestras irrigadas únicamente con agua (SW) se asociaron en un único cluster. Por el contrario, las muestras irrigadas con la solución de Hoagland sin nitrato (SH) presentan la mayor divergencia entre ellas, ubicándose en diferentes posiciones en el análisis de agrupamiento.

3.6.4.- Análisis del T-RFLP como herramienta de identificación de diazótrofos.

La comparación entre T-RFs obtenidos experimentalmente y T-RFs teóricos obtenidos a partir de la digestión *in silico* de secuencias completas del gen *nifH* puede brindar una idea preliminar de la composición de los ensambles de diazótrofos en el suelo. La determinación del error experimental de la determinación se realizó comparando los T-RFs observados y esperados para diazótrofos conocidos. La comparación entre los T-RFs observados y los esperados de *B. japonicum* mostró una desviación de 3 a 4 bases en los fragmentos mayores

a 164 bp, pero esta diferencia se incrementó de 7 a 14 pb para fragmentos más pequeños de 100 (Tabla 13).

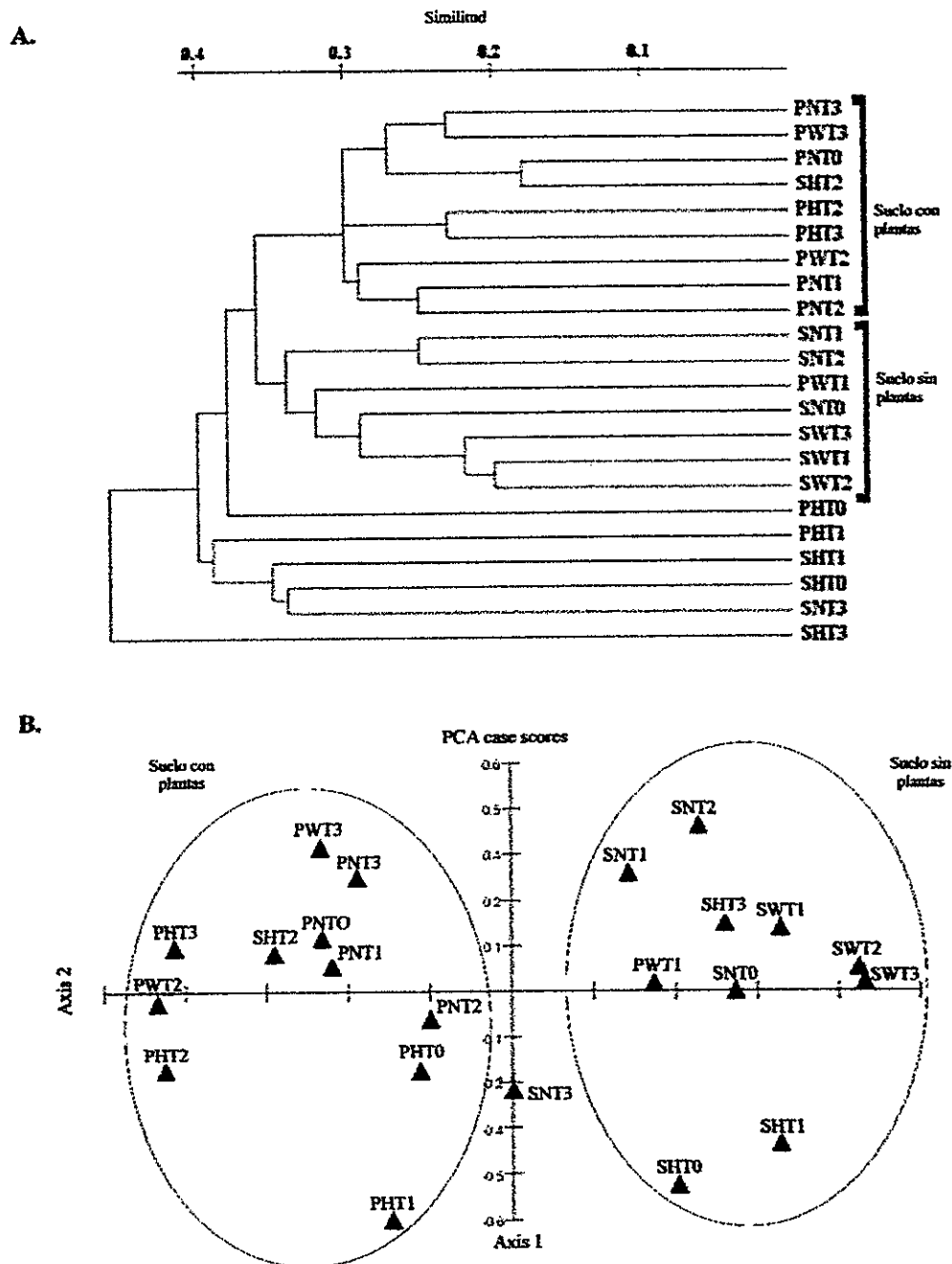


Figura 20.- Análisis de agrupamiento de los patrones de T-RFLP para el gen *niff1*. A. Análisis realizado con el programa TreeCon. B. Análisis de PCA. Los agrupamientos principales están indicados.

Tabla 13.- Comparación de los tamaños de los T-RFs experimentales y teóricos obtenidos en especies conocidas de diazótrofos.

		<i>B. japonicum</i>			<i>A. ferrooxidans</i>		
		Esperado	Observado	Diferencia	Esperado	Observado	Diferencia
<i>HaeIII</i>	Forward	242	239	3	97	106	9
	Reverse	189	185	4	142	84	58
<i>MspI</i>	Forward	164	161	3	164	370	206
	Reverse	190	188	2	33	49	16
<i>MboI</i>	Forward	68	61	7	87	105	18
	Reverse	47	61	14	51	74	23

Esta comparación también fue realizada en *A. ferrooxidans* usando tres secuencias de *nifH* publicadas en la red. Los T-RFs teóricos de estas secuencias variaron significativamente entre sí (datos no mostrados) al igual que al ser comparadas con los resultados experimentales (Tabla 13), generando diferencias que no pueden ser explicadas con base en el error experimental.

Para la inferencia de la composición de los ensamblajes de diazótrofos en las muestras de suelo se compararon los T-RFs experimentales con T-RFs teóricos obtenidos de una base de datos de secuencias completas de *nifH*. En la mayoría de los casos, los T-RFs teóricos no correspondieron a especies únicas y por consiguiente, en el análisis se realizó con grupos de especies (Fig. 21).

La mayoría de los T-RFs obtenidos en las muestras de suelo no coincidieron con ningún T-RF predicho de la base de datos, indicando la existencia de una alta proporción de diazótrofos no identificados en el suelo. No obstante algunos grupos de diazótrofos fueron identificados con base en los patrones de T-RFLP. Las especies más representadas correspondieron a bacterias rizobiales, aunque también se observó otras bacterias típicas del suelo tales como *Burkholderia* y *Frankia*. La comparación de los resultados obtenidos para las diferentes digestiones realizadas produjo resultados concordantes entre sí.

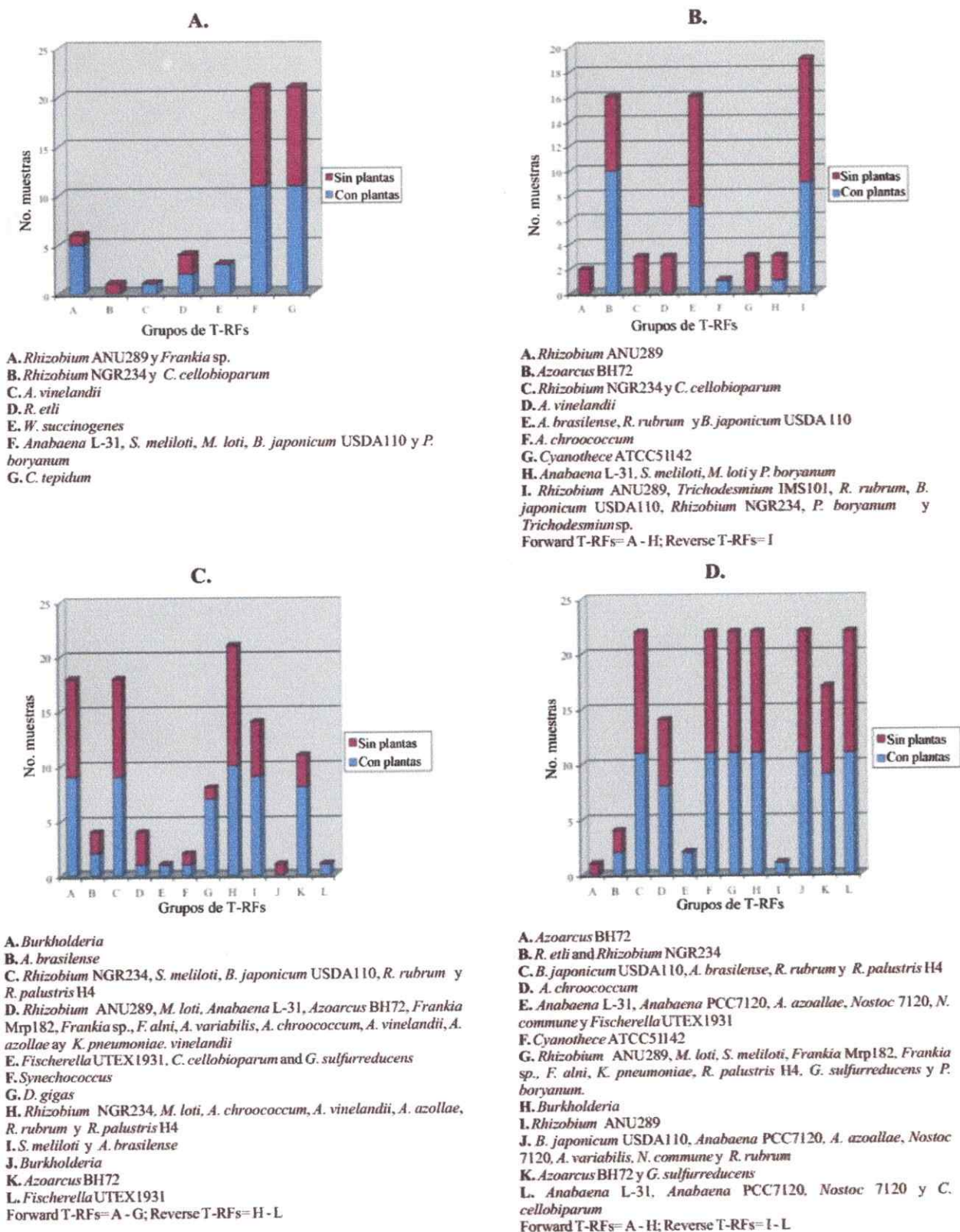


Figura 21.- Identificación potencial de los T-RFs en el suelo. Los T-RFs experimentales fueron comparados con T-RFs generados a partir de una base de datos de secuencias de *nifH*. A. *HaeIII*. B. *HaeIII/MspI*. C. *MboI*. D. *MspI*. La distribución de los T-RFs en suelo plantado (azul) y sin plantar (rojo) está indicada en la figura.

3.7.- Composición de bacterias rizobiales en suelo y nódulos.

3.7.1.- Desarrollo de marcadores moleculares específicos para analizar la composición de poblaciones rizobiales.

Para el diseño de partidores específicos para el estudio de bacterias rizobiales se alinearon varias secuencias completas del gen *nifD*. En el alineamiento se observó que las secuencias rizobiales conforman un clado coherente con el cual se realizó un segundo alineamiento específico para el diseño de partidores. Finalmente se seleccionó los partidores nifDF431-nifDR781 debido a que producen un fragmento adecuado para el análisis de DGGE (350 pb). Al ser evaluados contra la base de datos de GenBank se observó que estos partidores detectan exclusivamente secuencias rizobiales (datos no mostrados). También se diseñaron partidores específicos para PCR anidado del gen *nifH* dentro de la región previamente amplificada por los partidores PolF-PolR (Poly et al., 2001). Todos los partidores diseñados mostraron alta especificidad por secuencias rizobiales. Finalmente dos combinaciones de partidores (PolF-nifHR478 y nifHF123-PolRR) fueron obtenidas.

La amplificación específica de los partidores diseñados para *nifD* fue evaluada en bacterias rizobiales y en los nódulos colectados de las plantas de frijol. Asimismo, la amplificación se evaluó en otras bacterias diazótrofes no rizobiales (*A. ferrooxidans*, *Frankia* Tq15 y *B. fungorum*) y en bacterias no diazótrofes (*Streptomyces lividans* y *S. ambofaciens*). En todos los casos se obtuvo amplificación únicamente en las muestras rizobiales (datos no mostrados). Tanto en el DNA de nódulos como en el suelo, se obtuvieron amplicones del tamaño esperado. Sin embargo en los cultivos puros, se obtuvo más de una banda en el PCR en todas las cepas evaluadas (datos no mostrados).

Las diferentes combinaciones de partidores para la amplificación de *nifH* fueron evaluadas en los mismos microorganismos ya mencionados. La combinación PolF-nifHR478 en el primer PCR y la combinación nifHF123GC-PolRR en el PCR anidado, produjo los mejores resultados para obtener productos de PCR para DGGE. En el caso de *nifH* se obtuvo en el DNA de las muestras de bacterias rizobiales, aunque también se obtuvo productos de PCR en los diazótrofos *A. ferrooxidans* y *B. fungorum* (datos no mostrados).

Con el fin de optimizar el protocolo de DGGE, las características de desnaturalización de los productos de PCR de ambos genes fueron establecidas en geles en gradiente perpendicular, como se mencionó anteriormente. En el caso del amplicón de *nifD* obtenido de nódulos, la desnaturalización ocurre sobre un 80% (Fig. 22A), por lo cual el gradiente de separación en los experimentos se determinó en 40-70%. En el experimento de *time travel* se determinó 10 h como el tiempo de corrida para eliminar la interferencia de artefactos del PCR (Fig. 22B). En el caso de *nifH*, los resultados de la estandarización fueron idénticos a los mencionados para *nifD* (datos no mostrados).

3.7.2.- Análisis de la composición de bacterias rizobiales en el suelo.

Los patrones de DGGE de *nifD* en el suelo plantado con *P. vulgaris* (tratamiento P), mostraron que la composición de bacterias rizobiales permanece estable en el tiempo (Fig. 23). Por el contrario, la comparación de los patrones de DGGE en suelo no plantado (tratamiento S), muestra cambios marcados en la composición de rizobiales (Fig. 23). El análisis de agrupamiento de los patrones de DGGE corrobora el efecto de la planta sobre la composición de bacterias rizobiales en el suelo (Fig. 24A), dado que todas las muestras del tratamiento P son más similares entre sí, en comparación con las muestras del tratamiento S. Para las bacterias rizobiales, la planta parece ser el factor más importante en la

modificación de la composición de la comunidad, dado que el agrupamiento de los patrones de *nifD* no muestra ningún efecto de las condiciones de riego.

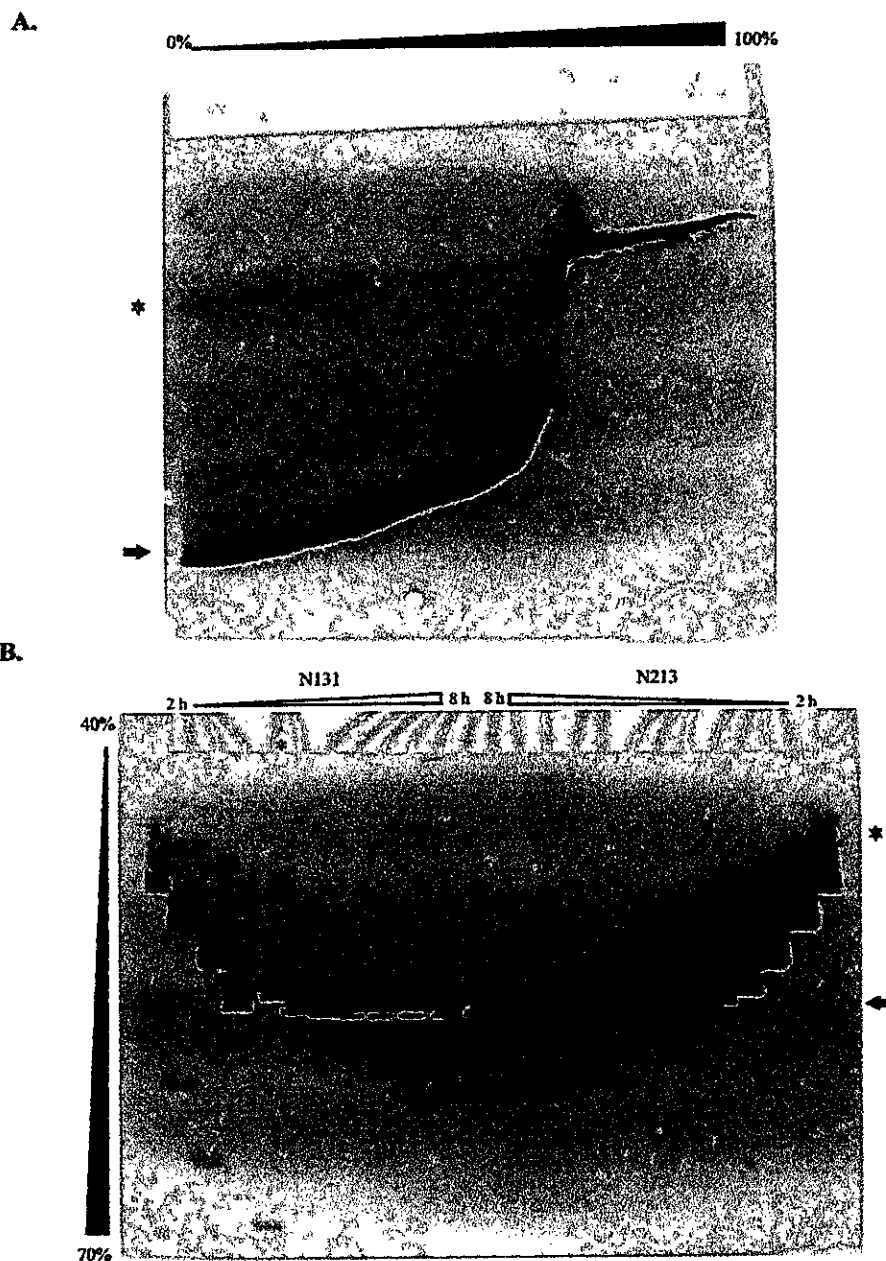


Figura 22.- Estandarización del análisis de DGGE para los productos del gen *nifD*. A. Gel en gradiente perpendicular para los productos de PCR del nódulo N131. B. Experimento de *time travel* para los productos de PCR de los nódulos N131 y N213. Las flechas indican la banda analizada. La estrella señala DNA de hebra simple. *= las muestras están invertidas.

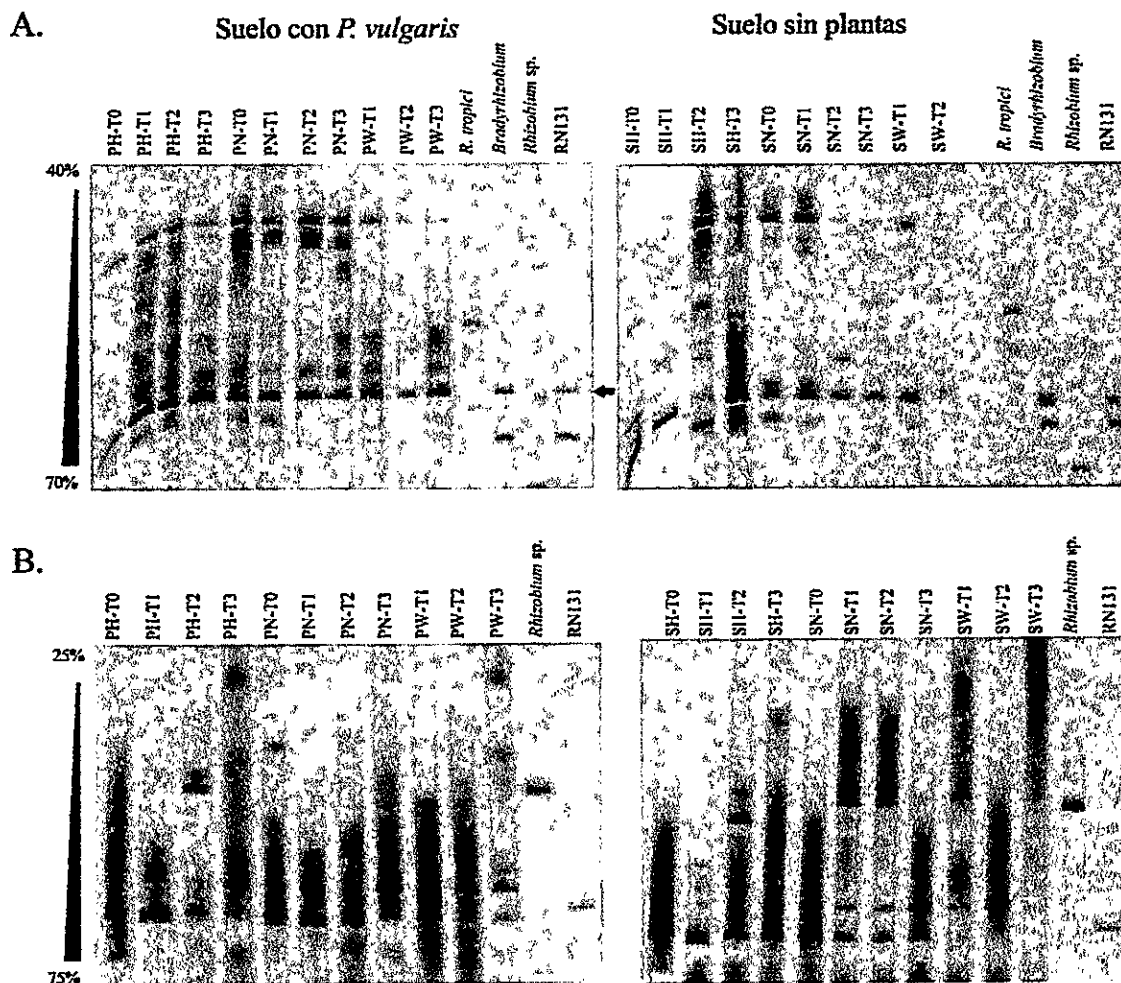


Figura 23.- DGGE de los amplificones de *nifD* (A) y *nifH* (B) en las muestras de suelo. Las muestras correspondientes a los tratamientos de suelo con o sin plantas están indicadas. La flecha señala la banda coincidente con nódulos (ver Fig. 27).

En comparación con los resultados obtenidos para *nifD*, el análisis de los patrones obtenidos en el caso de *nifH* no muestra el efecto de la presencia de la planta leguminosa hospedera (Fig. 23B). El análisis de agrupamiento confirmó esta observación, y como se observa en el dendrograma mostrado en la Figura 24B, la asociación de las muestras no guarda relación con los tratamientos incluyendo tanto la presencia de la planta, como las diferentes condiciones de riego evaluadas.

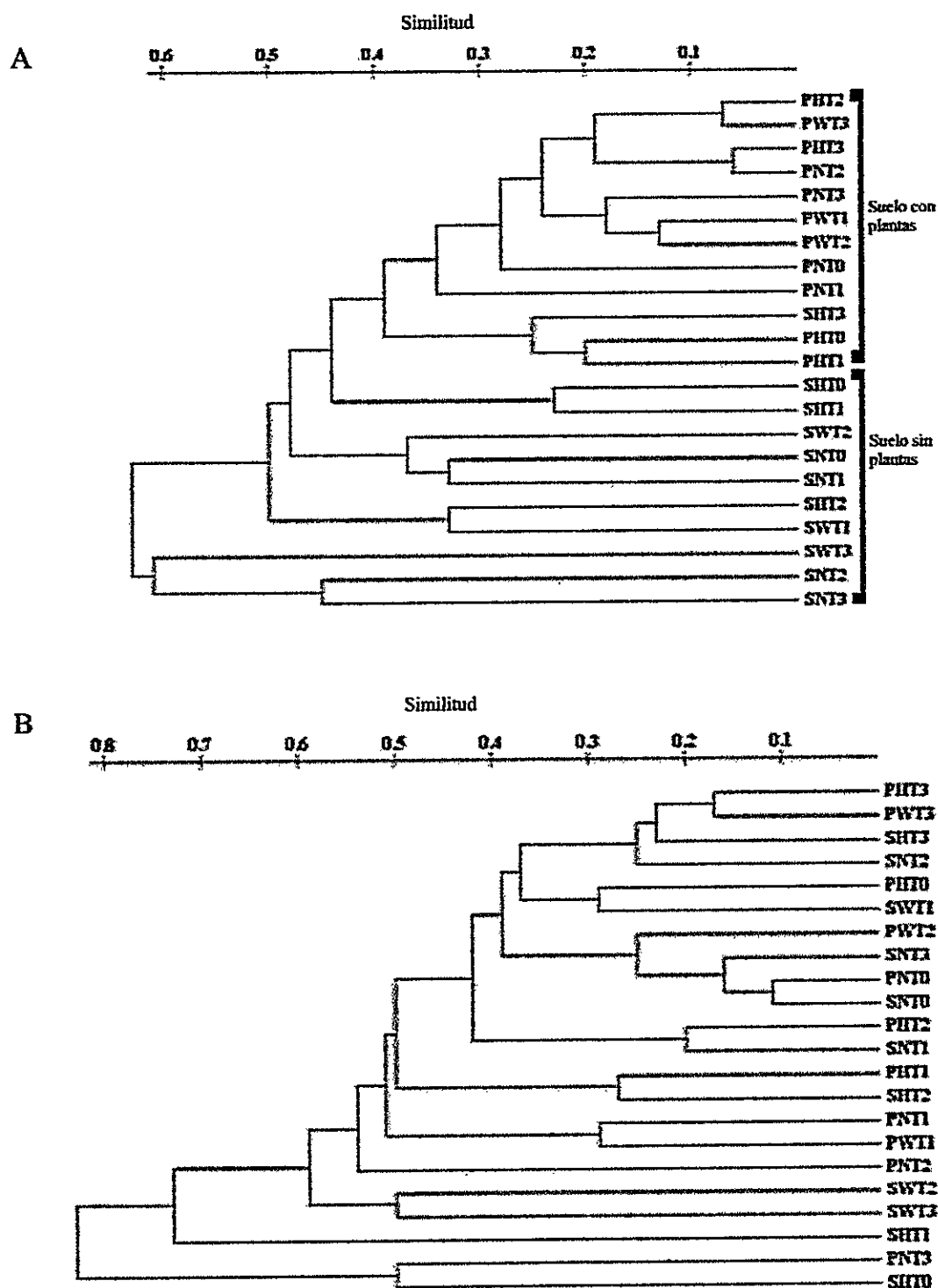


Figura 24.- Análisis de agrupamiento de los patrones de DGGE para *nifD* (A) y *nifH* (B). La similitud fue definida por la distancia de Nei y Li. Agrupamiento mediante el método de UPGMA.

Los resultados contradictorios obtenidos para *nifD* y *nifH* resultan inesperados si ambos marcadores tuvieran como blanco el mismo grupo microbiano. Por consiguiente, se determinó si existían diferencias en la especificidad de los partidores clonando y secuenciando productos de ambos genes en el suelo. En el caso de *nifD*, la identificación inicial de las secuencias por BLASTN mostró que en su mayoría éstas fueron relacionadas con secuencias del gen *nifD* de *R. etli*. Un análisis filogenético incluyendo diversas secuencias de bacterias rizobiales mostró que las secuencias de suelo determinadas estuvieron relacionadas con secuencias de *nifD* de los géneros rizobiales *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* (Fig. 25), confirmando los resultados del BLASTN.

La comparación de las secuencias de *nifH* obtenidas en el suelo mediante BLASTN mostró que la mayoría de los clones se relacionan con secuencias de *nifH* de diazótrofos no cultivados y con unas pocas secuencias rizobiales. El análisis filogenético en el suelo mostró que las secuencias determinadas se agruparon con diversos diazótrofos no relacionados con bacterias rizobiales (Fig. 26), confirmando la suposición de menor especificidad de estos partidores para la amplificación de bacterias rizobiales.

3.7.3.- Análisis de la composición de la población microsimbionte en nódulos.

El análisis de los patrones de *nifD* en 17 nódulos diferentes colectados de 4 plantas mostró baja variabilidad. En todos los nódulos se observó una única banda que correspondió con la banda observada en *Bradyrhizobium* CIAT3101 y en RN131 (Fig. 27A). Esta banda coincide con una de las bandas observadas en suelo con la planta leguminosa hospedera (Fig. 24). Esta banda fue clonada y secuenciada, identificando positivamente el gen *nifD* de *R. etli*. Esta identificación se confirmó en el análisis filogenético mostrado previamente en la Figura 25.

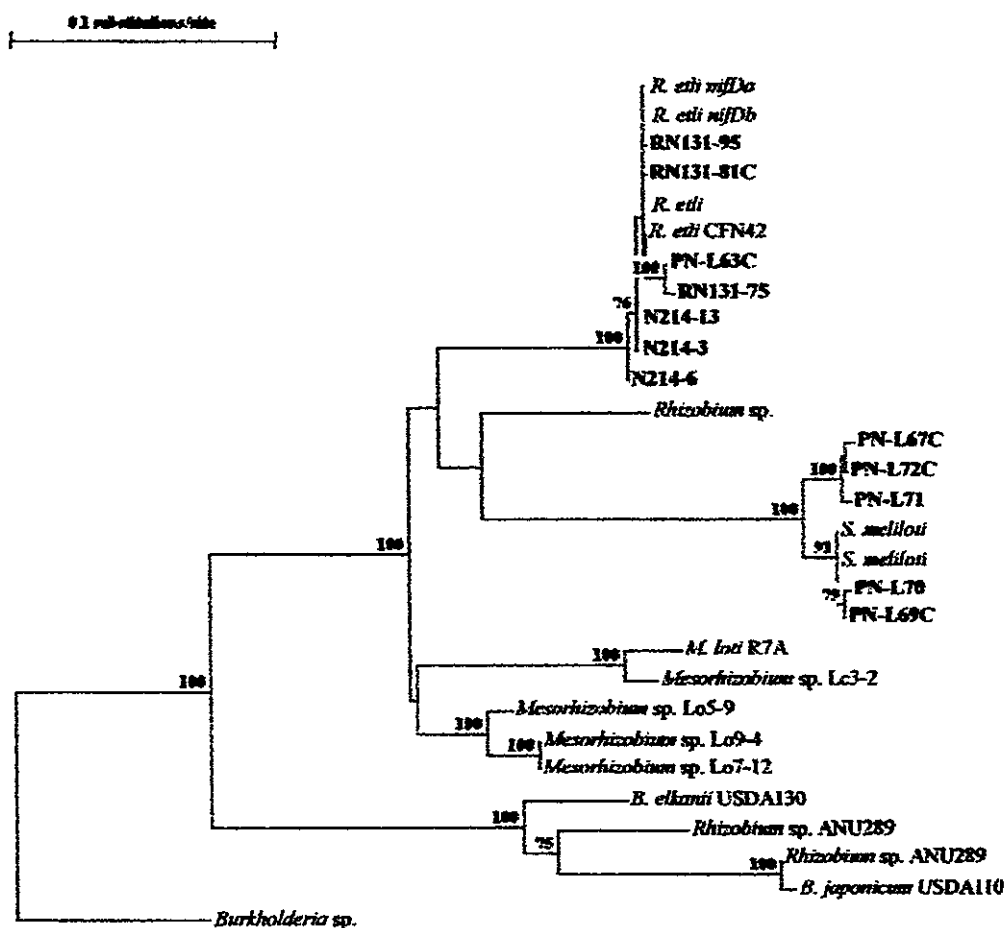


Figura 25.- Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *nifD*. El árbol se construyó usando el método de *Neighbor-joining*. Solo se muestran valores de *bootstrap* mayores al 70%. Secuencias analizadas (accesión): *R. etli* p42d (NC_004041); *R. etli* CFN42 (U80928); *Rhizobium* sp. (M26962); *S. meliloti* plasmid pSymA (NC_003037); *M. loti* R7A (AL672114); *Mesorhizobium* sp. Lc3-2 (AF411040); *Mesorhizobium* sp. Lo5-9 (AF411037); *Mesorhizobium* sp. Lo9-4 (AF411038); *Mesorhizobium* sp. Lo7-12 (AF411039); *B. elkanii* strain USDA 130 (AF484268); *Rhizobium* sp. ANU289 (45787); *B. liaoningense* (AF484263); *B. japonicum* USDA 110 (AF005941). Outgroup: *Burkholderia* sp. (AF194084).

0.1 substitutions/site

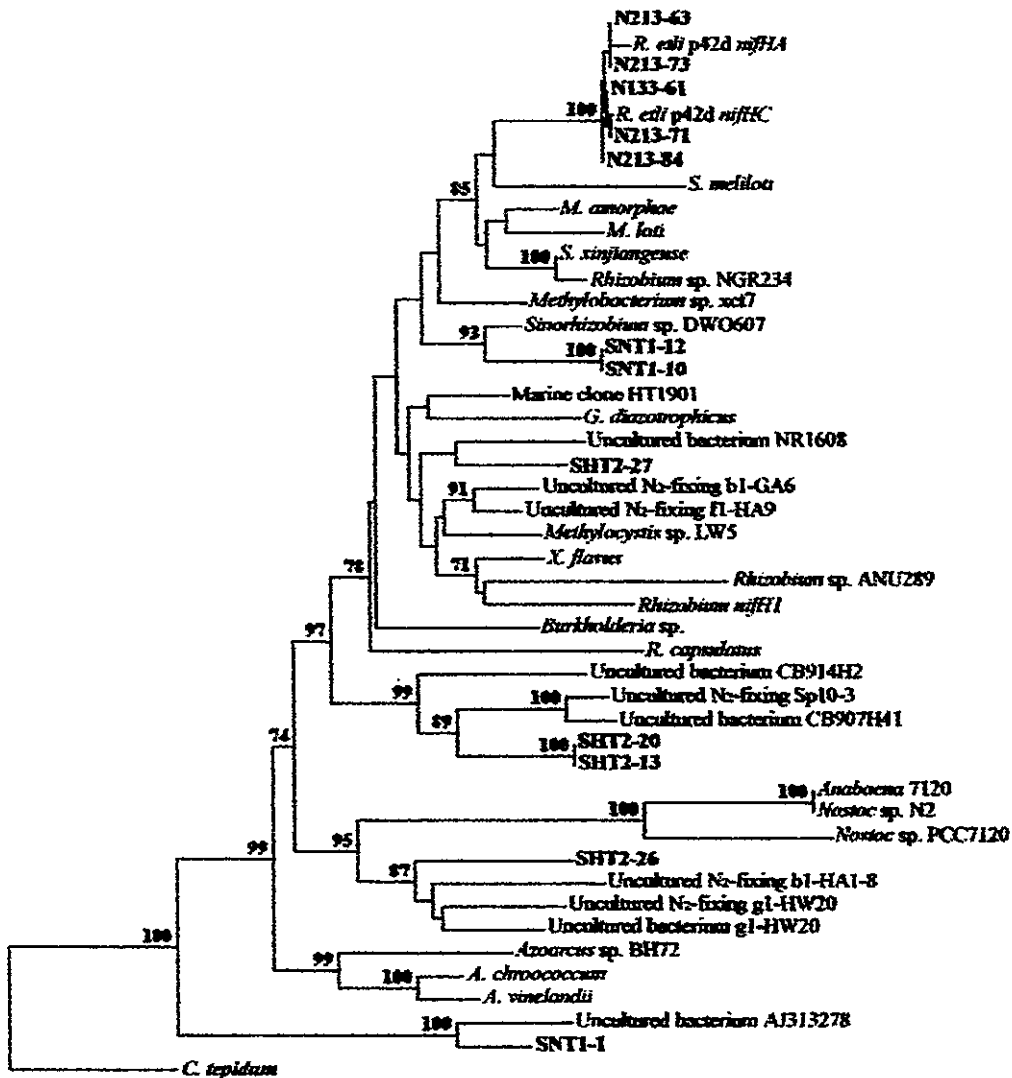


Figura 26.- Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *nifH*. El árbol se construyó por el método de *Neighbor-joining*. Sólo se muestran valores de *bootstrap* mayores a 70%. Secuencias analizadas: *R. etli* p42d (NC_004041); *S. meliloti* plasmid pSymA (NC_003037); *M. amorphae* (AF484651); *M. loti* (AP003007); *S. xinjiangense* (AF484652); *Rhizobium* sp. NGR234 (16519640); *Methylobacterium* sp. *xcI7* (AF484657); *Sinorhizobium* sp. DWO607 (Z95219); unidentified marine bacterial clone HT1901 (AF299426); *Gluconacetobacter diazotrophicus* (AF030414); uncultured bacterium NR1608 (AF035492); uncultured nitrogen-fixing bacterium clone b1-GA6 (AY196395); uncultured nitrogen-fixing bacterium clone fl-HA9 (AY196448); *Methylocystis* sp. LW5 (AF378719); *Xanthobacter flavus* (AY221812); *Rhizobium* sp. ANU289 (K00487); *Rhizobium nifH1* (M16709); *Burkholderia* sp. (AF194084); *Rhodobacter capsulatus* (X07866); Uncultured bacterium clone CB914H2 (AY224027); uncultured nitrogen-fixing bacterium clone Sp10-3 (AY091888); uncultured bacterium clone CB907H41 (AY223974); *Anabaena* 7120 (V00001); *Nostoc* sp. N2 (AF124379); *Nostoc* sp. PCC 7120 (AP003585); uncultured nitrogen-fixing bacterium clone b1-HA1-8 (AY196367); uncultured nitrogen-fixing bacterium clone g1-HW20 (AY196407); uncultured bacterium clone CB893H21 (AY223920); *Azoarcus* sp. BH72 (AF200742); *Azotobacter chroococcum* (M73020); *A. vinelandii* (M20568); uncultured bacterium (AJ313278); *Chlorobium tepidum* (NC_002932).

En el caso de *nifH* dos morfotipos diferentes que comparten la mayoría de bandas en el patrón fueron definidos en los nódulos (Fig. 27B). La secuenciación indicó que los productos de PCR corresponden al gen *nifH* de *R. etli* (ver filogenia en la Figura 25), confirmando los resultados de *nifD*. A diferencia de *nifD*, los patrones de *nifH* observados en los nódulos no coinciden con los patrones observados en suelo, debido a que como se mencionó ambos marcadores permiten analizar grupos de diazotófos diferentes y en el caso de *nifH* en el suelo los partidores amplifican diazotófos no relacionados con bacterias rizobiales.

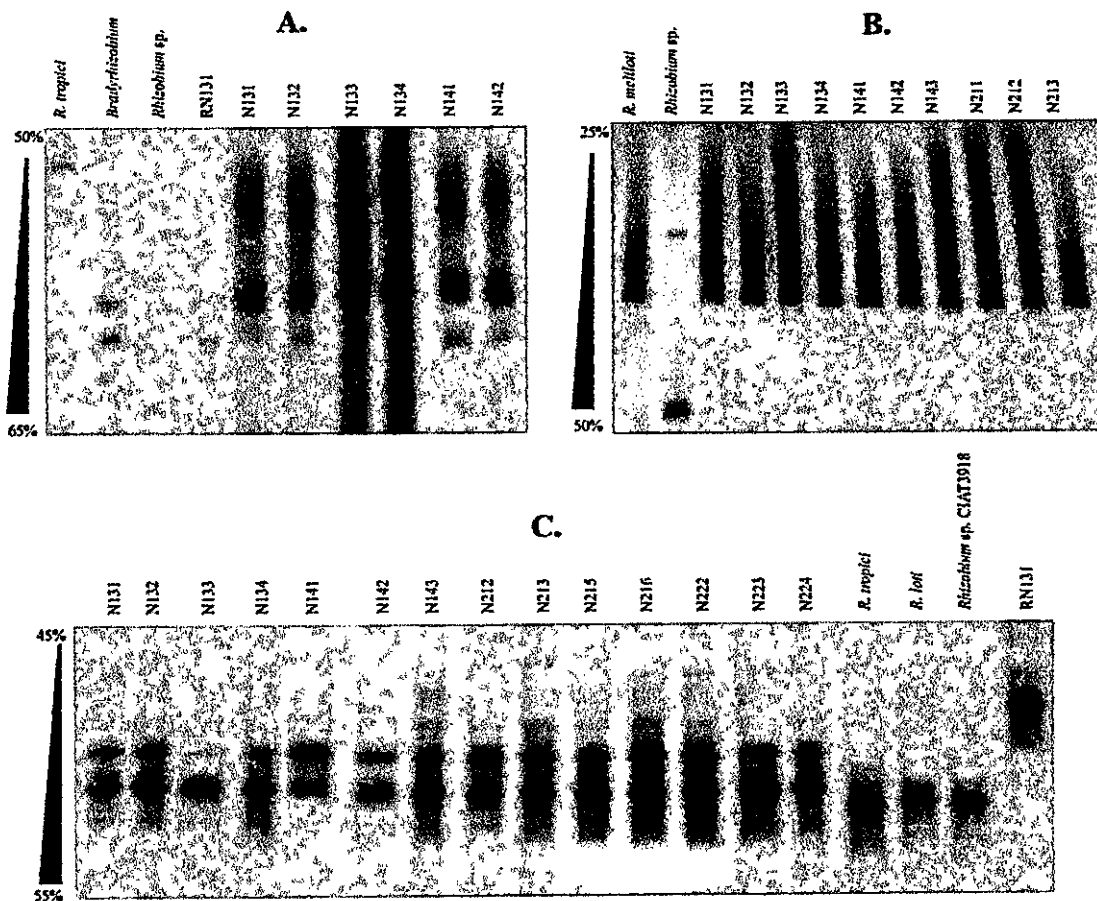


Figura 27.- Composición de las poblaciones microsimbiontes en nódulos de *P. vulgaris*. A. DGGE del marcador *nifD*. B. DGGE del marcador *nifH*. C. DGGE de productos de PCR del gen 16S rDNA.

La composición de la población microsimbionte de los nódulos de *P. vulgaris* fue analizada también comparando los polimorfismos presentes en la secuencia del gen 16S rDNA. El análisis de amplicones del 16S rDNA mediante DGGE en los nódulos mostró la existencia de un único ribotipo (Fig. 27C). La clonación y secuenciación del 16S rDNA confirmó los resultados obtenidos con los marcadores funcionales, identificando a *R. etli* CF42, como el microsimbionte obtenido. Sin embargo, al comparar los resultados del análisis directo de los nódulos con la bacteria aislada del nódulo N131 (RN131), se observó que existen diferencias en los patrones de DGGE (Fig. 27C), las cuales fueron confirmadas con la secuenciación del 16S rDNA para el aislado RN131 que correspondió a *Phyllobacterium myrsinacearum*.

Un segundo grupo de nódulos fueron obtenidos en un campo experimental del INIA (La Plata) y de plantas cultivadas un año después en el laboratorio. El análisis directo de los nódulos mostró nuevamente el mismo ribotipo para el gen 16S rDNA. Asimismo, en estos nódulos se observaron diferencias entre la fracción total y la fracción cultivable (datos no mostrados).

3.7.4.- Nódulos rizobiales como una posible asociación compleja entre bacterias.

3.7.4.2.- Presencia de bacterias oxidadoras de amonio (AOB) en los nódulos.

Considerando las diferencias observadas entre la fracción total y la fracción cultivable observada en los nódulos, la existencia de otros grupos bacterianos no rizobiales en los nódulos fue evaluada por PCR. Teniendo en cuenta que en el nódulo existe un aumento de la concentración de NH_3 debido a la fijación de nitrógeno, se evaluó la presencia de AOB

mediante amplificación con partidores específicos. Los patrones obtenidos mostraron una gran variabilidad de bacterias no rizobiales asociadas con los nódulos (Fig. 28).

Con el fin de identificar estos microorganismos, los productos de PCR del 16S rDNA específico de AOB obtenidos en los nódulos N133 y N213 fueron clonados y secuenciados. El análisis filogenético de estos clones mostró la relación de algunas de las secuencias obtenidas en los nódulos con Gamma-AOB, aunque en su mayoría las secuencias estuvieron relacionadas con bacterias de los géneros *Variovorax* y *Comamonas* pertenecientes a las Betaproteobacteria (Fig. 29).

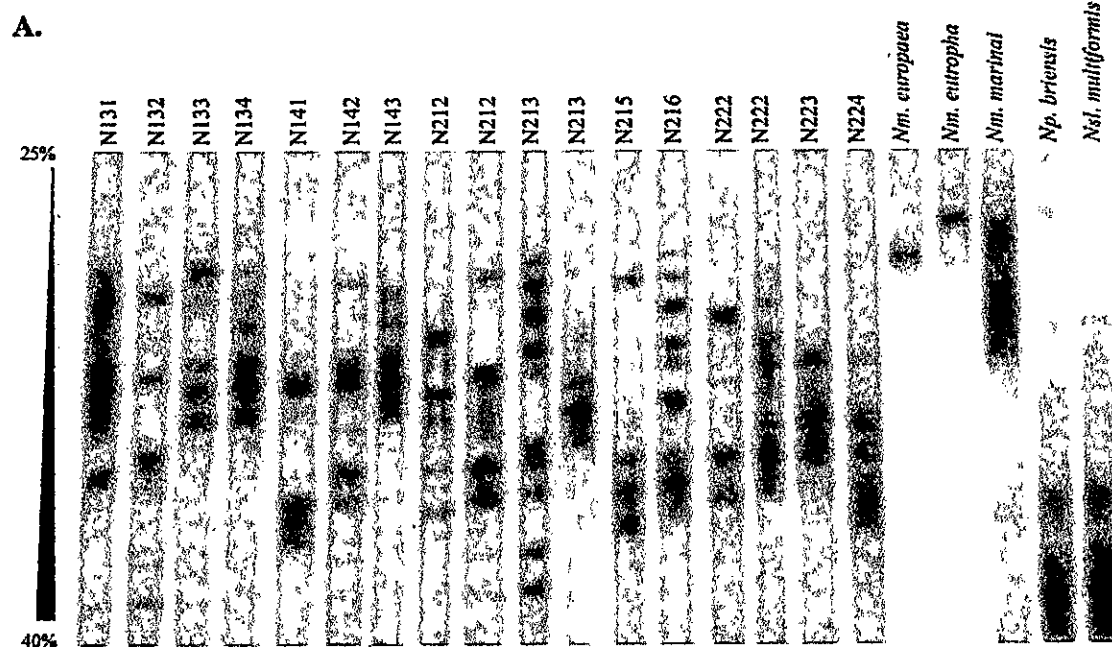


Figura 28.- Análisis de los productos del 16S rDNA específicos para AOB en los nódulos de *P. vulgaris*.

3.7.4.3.- FISH

Se realizó ensayos preliminares de FISH en los nódulos macerados para confirmar la presencia de estas bacterias no rizobiales. Hibridaciones con la sonda específica ALF968

mostraron que los nódulos están ocupados principalmente por *Rhizobium*, aunque la señal fue débil (Fig. 30).

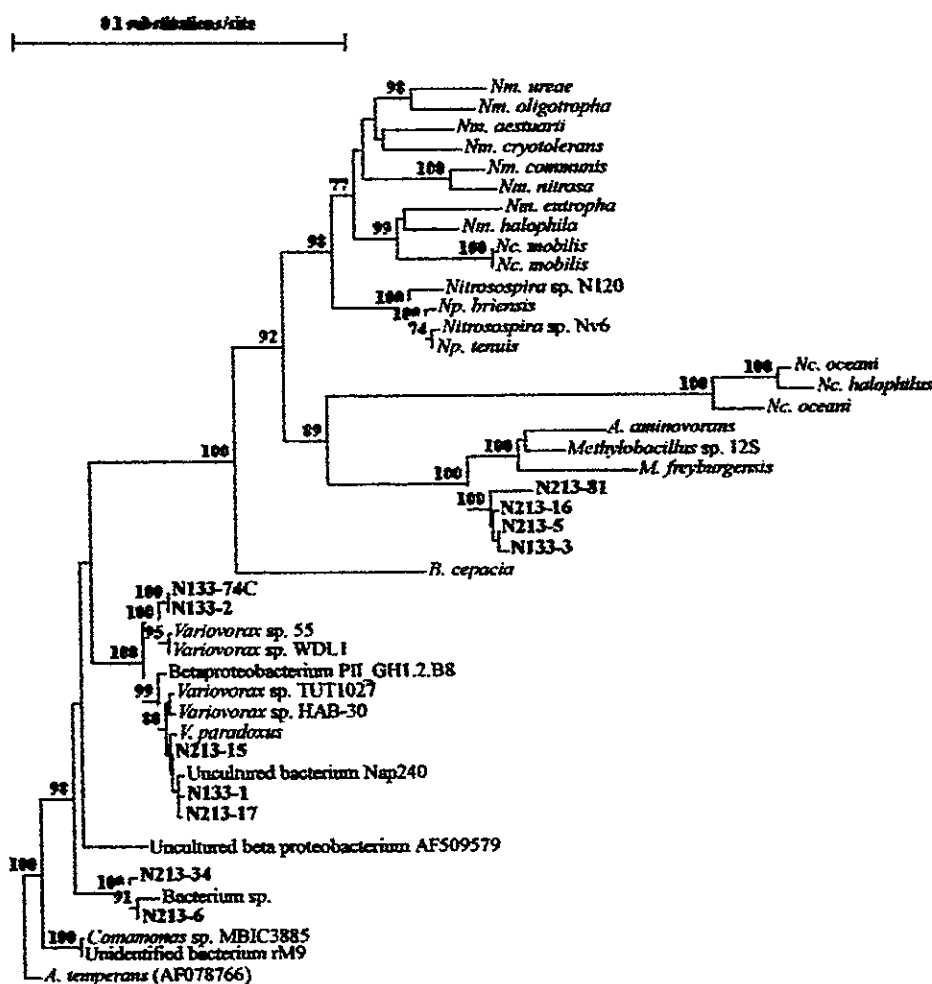


Figura 29.- Dendrograma mostrando la relación de las secuencias de 16S rDNA amplificadas en los nódulos con secuencias de AOB y las secuencias más relacionadas en el BLAST. Árbol construido usando el método *Neighbor-joining*. Solo se muestran valores de *bootstrap* mayores al 70%. Secuencias usadas como referencia: *Nitrosomonas ureae* (AJ298730); *Nm. oligotropha* (AJ298736); *Nm. aestuarii* (AJ298734); *Nm. cryotolerans* (AJ298738); *Nm. communis* (AJ298732); *Nm. nitrosa* (AJ298740); *Nm. eutropha* (AJ298739); *Nm. halophila* (AJ298731); *Nc. mobilis* (AJ298728); *Nitrosococcus mobilis* (AJ298728); *Nitrosospira* sp. NI20 (AJ298729); *Np. briensis* (AJ298741); *Nitrosospira* sp. Nv6 (AJ298747); *Nsp. tenuis* (AJ298746); *Nc. oceani* (AJ298727); *Nc. halophilus* (AJ298748); *Nc. oceani* (AJ298726); *Aminomonas aminovorans* C2A1 (AY027801); *Methylobacillus* sp. 12S (AB027139); *Methylobacillus freyburgensis* (AJ517772); *B. cepacia* CC-88192 (AY337584); *Variovorax* sp. 55 (AY238498); *Variovorax* sp. WDL1 (AF538929); Beta proteobacterium PII_GH1.2.B8 (AY162061); *Variovorax* sp. TUT1027 (AB098595); *Variovorax* sp. HAB-30 (AB051691); *V. paradoxus* (AJ420329); Uncultured bacterium clone Nap240 (AF534203); Uncultured beta proteobacterium (AF509579); Bacterium sp. (Y11465); *Comamonas* sp. MBIC3885 (AB008429); Unidentified bacterium strain rM9 (AB021344); *Acidovorax temperans* (AF078766).

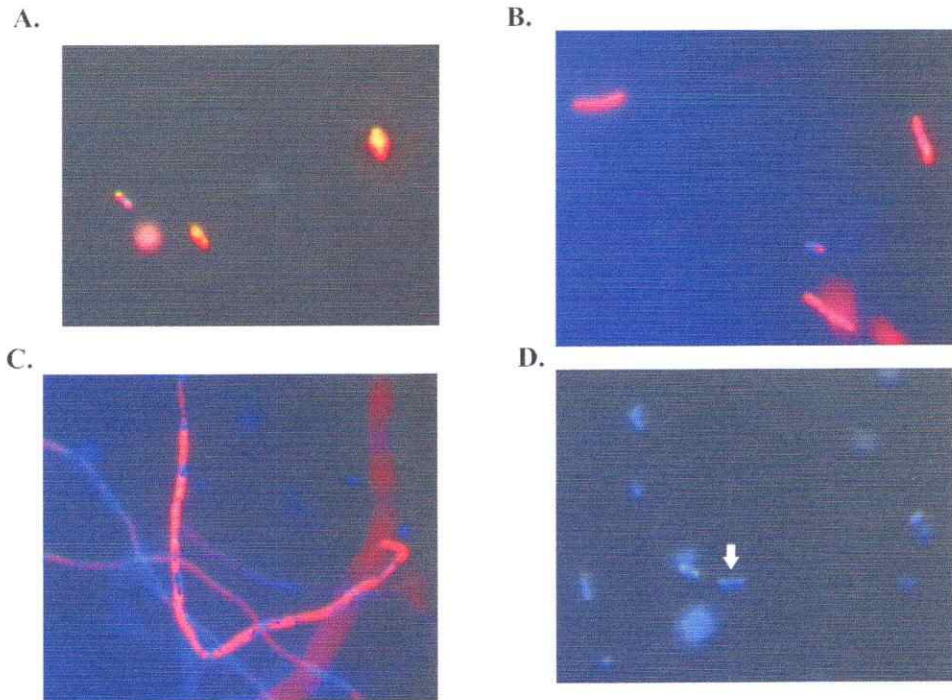


Figura 30.- FISH con la sonda específica de *Rhizobium* ALF968 (marcada con FITC) y Eub388 (marcada con Cy3) en *R. etli* (A), *V. paradoxus* (B), *C. testosteroni* (C) y macerados de nódulos de *P. vulgaris* (D). En los nódulos la tinción de DAPI solapa la señal de las sondas (indicado con una flecha).

Sondas específicas para las bacterias no rizobiales identificadas en los nódulos (BONE23A y Cte), mostraron los patrones de hibridación esperados con los controles positivos respectivos (datos no mostrados). Asimismo, señales de hibridación positivas fueron obtenidas con estas sondas en los macerados de nódulos (Fig. 31). En el caso de la sonda modificada BONE23Aga, en donde se reemplazaron dos bases que hacen que la sonda sea específica de los clones analizados, se observó que ésta no presenta hibridación con *V. paraadoxus* y *C. testosterona*, pero revela la presencia de señales de hibridación positivas en los nódulos (Fig. 32).

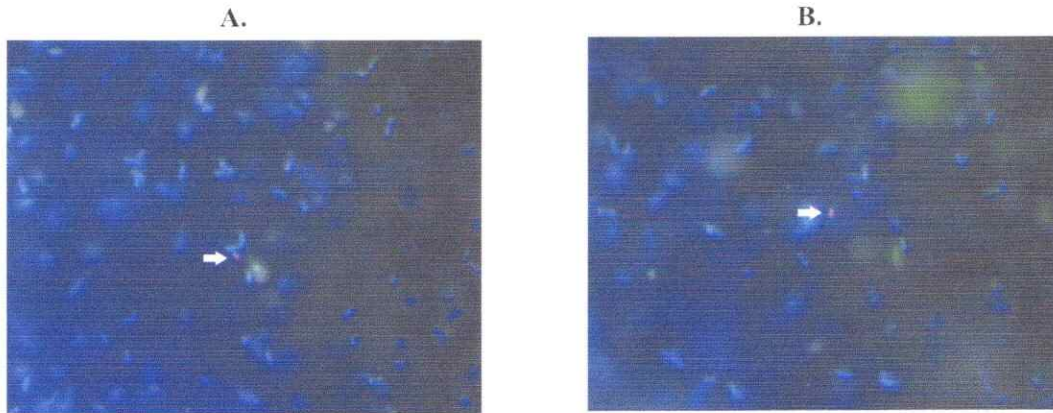


Figura 31.- FISH en macerados de nódulos hibridados con las sondas específicas para *Variovorax/Comamonas* BONE23A (A) y Cte (B) marcadas con Cy3. Las células de interés se indican con una flecha.

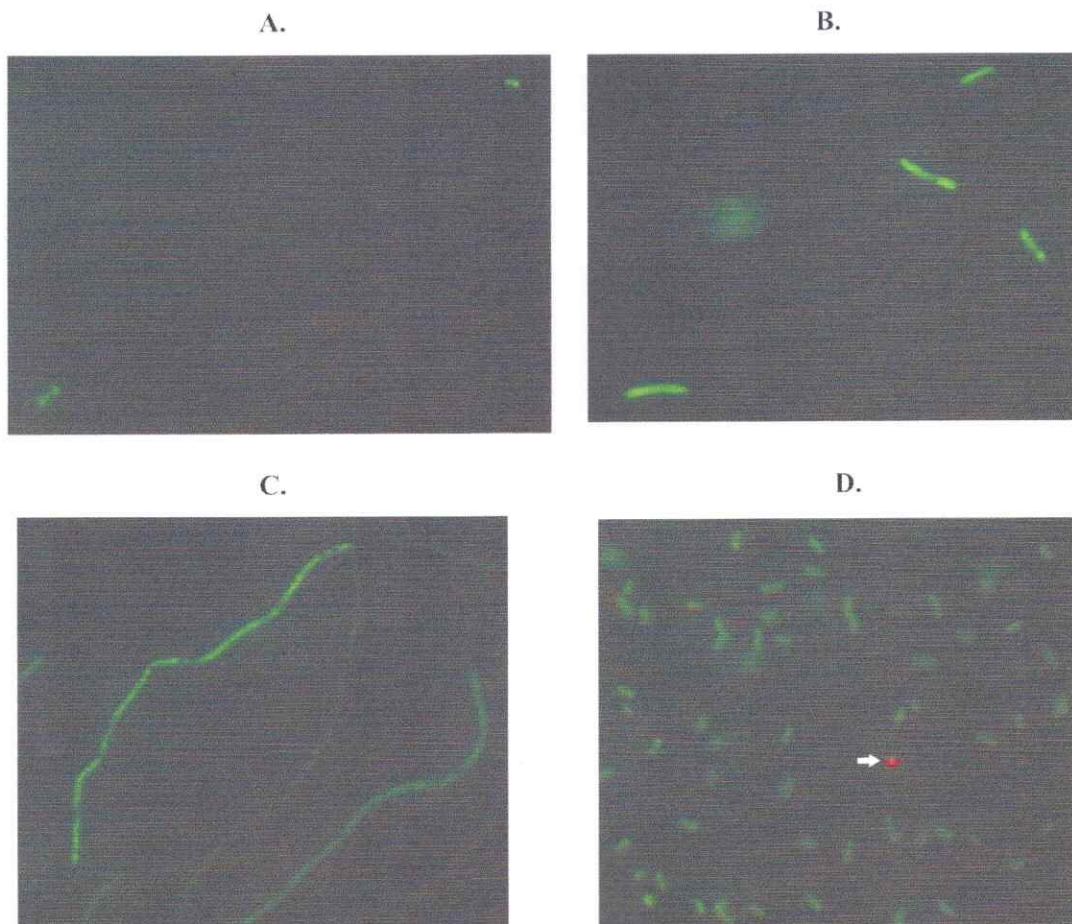


Figura 32.- FISH con Eub338 (FITC) y la sonda específica BONEAga (Cy3) diseñada para los clones encontrados. Hibridaciones en *R. etli* (A), *V. paradoxus* (B), *C. testosteroni* (C) y en macerados de nódulos de *P. vulgaris* (D). La señal de interés se indica con una flecha.

4. DISCUSIÓN

4.1.- Efecto rizosférico de *P. vulgaris* en el suelo como modelo experimental.

El análisis de los parámetros edáficos establecidos en este trabajo indica que la presencia de la planta leguminosa altera la disponibilidad de nitrógeno en el suelo (Tabla 3). Contrariamente al supuesto de que la presencia de la planta podría generar un ingreso adicional de nitrógeno disponible debido a su interacción con el microorganismo fijador de nitrógeno (*Rhizobium*), los resultados muestran que en los tratamientos con planta el nitrógeno disponible disminuye. Podría pensarse que la planta colecta el nitrógeno del suelo y que la transferencia de este elemento al suelo ocurre tras la mineralización del tejido vegetal. Por el contrario, en el suelo mantenido en ausencia de plantas, el contenido de nitrógeno disponible se incrementó.

Por otra parte, se ha propuesto que el suelo puede tolerar cambios poco drásticos en un tiempo limitado manteniéndose en un estado relativamente invariable (Piceno & Lovell, 2000), posiblemente explicando que otras variables edáficas tales como el balance de C/N en el suelo ó el pH no cambien a lo largo del ensayo en tratamientos con y sin planta (Tabla 3).

4.2.- Análisis de las comunidades microbianas en el suelo.

El efecto rizósferico de la planta leguminosa fue determinado inicialmente sobre la composición de bacterias totales del suelo. Los patrones de DGGE de los amplicones del 16S rDNA para bacterias totales, muestran la presencia de pocas bandas con gran intensidad. Estas bandas podrían corresponder a los miembros más abundantes de la comunidad. Sin embargo, se observó un gran número de bandas débiles pobremente

definidas en el patrón de DGGE (Fig. 6), las cuales podrían representar poblaciones bacterianas en el suelo con baja abundancia. El análisis de agrupamiento de los patrones de DGGE muestra que los cambios en la composición de las bacterias totales no se relacionan directamente con la presencia de la planta o las condiciones de riego, a pesar de las diferencias en el contenido de nitrógeno disponible en el suelo.

Previamente ha sido publicado que los patrones de DGGE de comunidades bacterianas totales altamente diversas son demasiado complejos, para permitir la correlación de dichos perfiles con variables específicas (Heuer et al., 1997; Boon et al., 2002). Por consiguiente, los resultados obtenidos en esta tesis en donde el análisis de los patrones de la comunidad bacteriana total no se correlacionó con el efecto rizosférico de *P. vulgaris* no son completamente inesperados. Podría esperarse que a diferencia de la comunidad bacteriana total, el análisis de gremios microbianos específicos relacionados con el ciclo del nitrógeno sea más adecuado para analizar el efecto rizosférico y de las condiciones de riego.

Los patrones de DGGE de amplicones del 16S rDNA específicos de bacterias oxidadoras de amonio no mostraron bandas débiles y pobremente definidas (Fig. 7), indicando que la composición de este gremio microbiano está caracterizada por la presencia de un número limitado de especies. En el análisis de agrupamiento las muestras se asociaron de acuerdo con los tratamientos estudiados, donde se observó un efecto inicial relacionado con el tiempo del muestreo y el efecto de la presencia de la planta en las últimas etapas del ensayo.

El agrupamiento observado de los patrones de DGGE específicos del gremio de AOB puede estar ligado a sus características fisiológicas. Se ha publicado previamente que estos microorganismos responden rápidamente a cambios en el ambiente incrementando su actividad metabólica sin generar un cambio en la composición del gremio. La composición

de AOB se modifica principalmente en intervalos más extensos de tiempo debido a su largo tiempo generacional (Kowalchuk & Stephen, 2001). Estos antecedentes explicarían el efecto de la presencia de la planta sobre la composición del gremio de AOB en los últimos tiempos de muestreo.

Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos en el análisis de las comunidades bacterianas totales y los resultados del gremio de bacterias nitrificantes llevan a considerar las limitaciones asociadas con la selección del grupo microbiano utilizado como blanco en un estudio ecológico. Podría postularse que estudios basados en el análisis de escalas de organización ecológicas mayores, como por ejemplo la comunidad bacteriana total, no permiten una correlación directa con variables específicas como el efecto rizosférico de *P. vulgaris*. Por el contrario, una escala de organización ecológica menor como por ejemplo el gremio de bacterias nitrificantes, si permite correlacionar cambios en la composición con el efecto rizosférico de *P. vulgaris*.

Resultados contrastantes entre lo observado para estudios basados en la comunidad total y el gremio de AOB han sido descritos previamente. Avrahami et al. (2002) observaron que en suelo incubado con diferentes concentraciones de amonio la estructura de los gremios de AOB y de bacterias desnitrificantes cambió significativamente, mientras que la comunidad bacteriana total fue sólo levemente afectada. En otros ambientes manejados por el hombre como las plantas de tratamientos de aguas residuales, el estudio de agrupamiento de bacterias totales en muestras de agua de las plantas de tratamiento no se correlacionó con diferentes condiciones fisicoquímicas evaluadas, mientras que el análisis específico de AOB produjo resultados que si se correlacionaron con los factores fisicoquímicos analizados (Boon et al., 2002). Este fenómeno parece no ser exclusivo de AOB, pues

resultados similares han sido obtenidos con otros grupos microbianos como las bacterias reductoras de nitrato (Philippot et al., 2002).

La comparación del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante DGGE muestra resultados similares a lo observado en la comunidad de bacterias totales y el gremio de AOB. El análisis específico de bacterias rizobiales mediante *nifD* mostró una clara influencia de la presencia de la planta hospedera sobre la composición del grupo (Fig. 25). Por el contrario, el análisis del gremio de diazótrofos en sentido amplio realizado con el marcador *nifH* no mostró el efecto de la presencia de la planta (Fig. 25).

Un factor adicional que debe ser considerado cuando se analizan las diferencias en los resultados de ambos marcadores de los genes de la nitrogenasa es su historia evolutiva. Los análisis filogenéticos basados en los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* pueden ser inconsistentes, dado la distribución de la diazotrofia en diferentes grupos no relacionados de microorganismos y la existencia de transferencia horizontal en estos genes (Zehr et al., 2003). Por ejemplo, se ha propuesto que los genes *nifD* y *nifK* se originaron debido a un evento de duplicación paróloga que involucró a su vez el operón *nifEN* (Fani et al., 2000) y por consiguiente, estos genes están más relacionados entre sí que con *nifH*.

La mayoría de los estudios en ensamblajes de diazótrofos han utilizado el gen *nifH* como marcador molecular. Esto explica porque la base de datos de secuencias de *nifH* es quizás una de las bases de datos no ribosomales más grandes en la actualidad. Una cantidad inferior de estudios han sido basados en el gen *nifD*, pero se ha sugerido que el análisis de la secuencia de este gen podría generar una mayor resolución de grupos de diazótrofos más relacionados (Zehr et al., 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta teoría dado que el uso de *nifD* permitió analizar un conjunto de secuencias de diazótrofos más

relacionados (bacterias rizobiales), mientras que *nifH* amplificó un espectro filogenético más amplio de microorganismos dentro de este gremio bacteriano.

El análisis de *nifH* mediante T-RFLP mostró resultados diferentes. Cuando se analizó los cambios en la composición de las comunidades de diazótrofos, se observó que estos mostraron una tendencia que los correlacionaba con los tratamientos evaluados (Fig. 20). Las diferencias entre ambas aproximaciones de análisis de *nifH* por DGGE o T-RFLP, pueden estar relacionadas con los grupos observados con cada uno de los partidores analizados. Los resultados de la identificación de los patrones de T-RFLP muestran la presencia de una gran proporción de bacterias rizobiales, mientras que en las librerías de clones generadas con los partidores de DGGE, estas bacterias están muy pobremente representadas. En este caso, la asociación de las muestras analizadas por T-RFLP puede ser similar a lo encontrado con el marcador específico para bacterias rizobiales (*nifD*), donde el efecto de la planta fue claramente observado.

Resultados recientes obtenidos por Bürgmann et al. (2004) muestran que la asociación de patrones de restricción de *nifH* difiere marcadamente cuando éstos son generados usando combinaciones de partidores con diferente especificidad. Estos autores encontraron que los patrones de agrupamiento derivados de los datos obtenidos con la combinación menos específica de partidores no se correlacionaron con los tratamientos analizados (dos tipos diferentes de suelos). En contraste, el análisis de agrupamiento de patrones generados con productos amplificados con una combinación específica de partidores mejoró la resolución y mostró el efecto de los tratamientos. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas en este trabajo, donde partidores más universales para la amplificación de *nifH* producen resultados con menor resolución con relación a los tratamientos analizados.

4.3.- Análisis de AOB con marcadores funcionales versus 16S rDNA.

Las bacterias oxidadoras de amonio ofrecen un modelo interesante para comparar los resultados obtenidos al analizar gremios microbianos empleando marcadores funcionales y el gen 16S rDNA simultáneamente. Al comparar los resultados obtenidos con ambos marcadores es posible observar diferencias significativas entre ellos.

En el caso del marcador funcional *amoA* se observó que existe un efecto de la adición de nitrato (tratamientos PN y SN) sobre la abundancia de AOB en el suelo. Este efecto correspondió a la disminución de los blanco de *amoA* en la mezcla original de DNA, independientemente de la presencia de la planta. Sin embargo, el análisis posterior por DGGE de los amplicones de *amoA* mostró que la composición del gremio en el suelo es poco variable (Fig. 12).

Estudios previos acerca de la composición de AOB en suelo mostraron que las modificaciones en el hábitat afectan principalmente la abundancia del gremio, más que su composición (Avrahami et al., 2002; Webster et al., 2002; Briones et al., 2003). Por ejemplo, Avrahami et al. (2002) determinaron que los patrones de DGGE del gen *amoA* permanecen invariables cuando muestras de suelo son incubadas con ninguna, poca, media o altas concentraciones de amonio. Estos resultados fueron contrastantes con la actividad del gremio dado que se observaron diferencias en las tasas de nitrificación (Avrahami et al., 2002). Mendum et al. (1999) llegaron a conclusiones similares analizando comunidades de AOB en suelo fertilizado y no fertilizado en un periodo corto de tiempo (6 semanas).

Por otra parte, el análisis del gremio de AOB a partir de los polimorfismos en la secuencia específica del gen 16S rDNA indicó que existen a su vez cambios en la composición de AOB relacionados con el tiempo de muestreo y la presencia de la planta. Las diferencias observadas entre ambos marcadores pueden ser analizadas en relación a la abundancia

relativa de AOB en el suelo en las muestras originales. La abundancia de AOB en diferentes ambientes ha sido estimada en menos del 0.1% de las bacterias totales en la muestra (Bothe et al., 2000; Silyn-Roberts & Lewis, 2001). En este trabajo, la amplificación del 16S rDNA con los partidores específicos para AOB falló cuando se realizó a partir de las muestras de suelo originales. Sin embargo, amplicones específicos fueron obtenidos en un segundo PCR anidado usando como templado los amplicones obtenidos para el 16S rDNA bacteriano, donde los blancos en la muestra original incrementan su concentración por pre-amplificación, por lo cual los resultados del gen 16S rDNA podrían ser más representativos de toda la diversidad de AOB presente en las muestras de suelo.

Se ha sugerido que el análisis de *amoA* resulta más resolutivo como marcador molecular dado que posee mayor variación de secuencia (Rotthauwe et al., 1997; Alzerreca et al., 1999; Norton et al., 2002). Considerando la homogeneidad de los patrones de DGGE de amplicones del gen *amoA*, puede suponerse que el suelo analizado contiene una baja variabilidad de AOB, lo que fue acorde con los resultados de la clonación en donde se detectaron únicamente secuencias relacionadas al género *Nitrospira*. La baja variabilidad de los clones de *amoA* puede estar de acuerdo con la observación general de baja diversidad de AOB en suelos agrícolas (Bruns et al., 1999). Asimismo, la dominancia de secuencias relacionadas con *Nitrospira* está acorde con la amplia distribución y dominancia de este género en la mayoría de ambientes naturales (Bothe et al., 2000; Whitby et al., 2001).

En contraste, el análisis de las secuencias del 16S rDNA mostró adicionalmente la presencia de clones relacionados con el género *Nitrosomonas*, los cuales estuvieron probablemente bajo el nivel de detección del marcador *amoA* debido a su baja abundancia.

Sin embargo, los resultados del 16S rDNA muestran que estos grupos menos representados fueron efectivamente afectados por las modificaciones del hábitat.

4.4.- Actividad *in situ* versus composición de los gremios microbianos.

En este trabajo se determinó la actividad *in situ* de las bacterias desnitrificantes y de las bacterias fijadoras de nitrógeno. En el caso de las bacterias desnitrificantes se observó previamente que éstas responden al efecto rizosférico (Philippot et al., 2002). En concordancia con esto, los resultados de este trabajo muestran que la presencia de la planta al alterar la disponibilidad de nitrógeno, modifica la actividad de las bacterias desnitrificantes. Así, las tasas de desnitrificación en T3 se correlacionaron positivamente con el aumento de nitrógeno disponible en todos los tratamientos de suelo sin plantas (Fig. 14).

De forma contrastante con los resultados de actividad, los diversos ensayos realizados para determinar la composición de las bacterias desnitrificantes fallaron. Las dificultades para la amplificación de los marcadores funcionales *nirS* y *nirK*, lleva a revisar la efectividad de los mismos. La imposibilidad para amplificar el gen *nirS* es esperable, dado que resultados recientes postulan que este gen es frecuentemente encontrado en muestras de sedimento, pero no en muestras de suelo, en donde predominan las bacterias desnitrificantes que portan el gen *nirK* (Braker et al., 2000; Priemé 2002).

En el caso del gen *nirK* el análisis de las secuencias mostró que los partidores disponibles para la amplificación de este gen difícilmente pueden ser considerados como partidores universales para el grupo, dado que numerosos microorganismos desnitrificantes, presentan poco homología de secuencia con las regiones blanco de los partidores.

El uso de genes funcionales para estudios ecológicos en muestras ambientales requiere de suficiente homología de secuencia nucleotídica para el diseño de partidores adecuados. Sin embargo, cuando una función se encuentra ampliamente distribuida entre microorganismos filogenéticamente no relacionados, se hace necesario el uso de partidores altamente degenerados, los cuales no abarcan necesariamente la diversidad de todos los miembros del grupo (Michotey et al., 2000), lo que ocurre en las bacterias desnitrificantes debido a que la función está ampliamente distribuida en una gran diversidad de microorganismos no relacionados. Por consiguiente, estudios concentrados en el análisis de un linaje particular de desnitrificantes puede ser una estrategia más adecuada para determinar la composición de este gremio microbiano.

Adicionalmente, algunas limitaciones de las metodologías de determinación de actividad *in situ* deben ser mencionadas. Aunque los experimentos de inhibición con acetileno son un procedimiento relativamente simple y sensitivo para determinar las tasas de desnitrificación (Knowles, 1982), los resultados requieren una discusión más detallada. Como puede observarse en los resultados obtenidos con las muestras control (sin adición de acetileno), existe una producción activa de N_2O en el suelo, independiente de la adición del inhibidor.

Diversos experimentos han sido llevados a cabo con el fin de cuantificar la contribución de aquellos procesos involucrados con la producción de N_2O en el suelo, indicando que en las muestras incubadas en ausencia del inhibidor, tanto la desnitrificación como la nitrificación y la desnitrificación de las nitrificantes, contribuyen con la producción de N_2O (Wrage et al., 2001; Usui et al., 2001).

En los resultados obtenidos en esta tesis, la tasa de desnitrificación más elevada en las muestras control, comparadas con las muestras tratadas con acetileno, sugiere que existe

por lo tanto una contribución activa no solo de la desnitrificación, sino también de la nitrificación y la desnitrificación de las bacterias a la producción de N_2O (Fig. 14).

Una explicación alternativa de estos resultados consiste en un proceso conocido como inhibición incompleta, en el cual la utilización de C_2H_2 por parte de diferentes microorganismos o procesos como la fijación de nitrógeno, conduce a unos registros inferiores de la producción de N_2O en las muestras tratadas (Knowles, 1982; DeBoer & Kowalchuk, 2001). Asimismo, el acetileno es un inhibidor de otros procesos tales como la nitrificación, y por lo tanto puede impedir la producción de nitrato, el sustrato de la desnitrificación.

Se ha sugerido que la actividad de la nitrogenasa generalmente es insuficiente para disminuir el efecto inhibitor del acetileno (Knowles, 1982). Sin embargo en conjunción con la inhibición de la nitrificación, puede sesgar los resultados explicando por ejemplo, las tasas de desnitrificación negativas obtenidas en T2, en donde se observó actividad de fijación de nitrógeno en el suelo.

En el caso de las tasas de fijación de nitrógeno, únicamente fue posible definir actividad *in situ* en el tiempo T2, observándose que la fijación fue afectada por la presencia de la planta. La ausencia de actividad en los otros puntos de muestreo puede estar correlacionada con la composición del ensamble de diazótrofos, dado que como se pudo observar en los resultados de T-RFLP, existe al parecer una alta representación de bacterias rizobiales, en las cuales la fijación de nitrógeno se lleva a cabo exclusivamente en simbiosis.

4.5.- Composición bacterias rizobiales en suelo y en las poblaciones microsimbiontes.

Diversos estudios han analizado el efecto de cambios en variables ambientales sobre la composición de diazótrofos. Bargett et al. (1999) han sugerido que en experimentos de

corta duración, la presencia de diferentes especies de plantas afectan la composición de la comunidad, más que otras propiedades físicas o químicas del suelo. Considerando esta evidencia, se podría esperar que en este ensayo la planta genere un efecto más pronunciado en la composición del ensamble de diazótrofos, conduciendo a la diferenciación de los tratamientos con o sin planta. Como ya se ha mencionado, el análisis de T-RFLP mostró esta tendencia, observándose un agrupamiento de las muestras con relación a la presencia o no de la planta (Fig. 19).

Por otra parte, la comparación entre secuencias de *nifH* en suelos con diferentes propiedades ha indicado que un contenido diferente de nitrógeno inorgánico en el suelo, afecta la composición de diazótrofos (Poly et al., 2000). Sin embargo, en experimentos de corta duración realizados en la rizósfera de *Spartina alterniflora* (Piceno & Novell, 2000), se observó que el ambiente rizosférico parece limitar el impacto inmediato de una concentración incrementada de nutrientes (específicamente nitrógeno y fósforo) en la composición del ensamble de diazótrofos. En este caso los resultados previos obtenidos por Piceno & Lovell (2000) apoyan los resultados observados en esta tesis, dado que no se observó un efecto de los tratamientos de riego en este experimento sobre la composición de diazótrofos en el suelo.

Sin embargo, diferencias en la composición de diazótrofos relacionadas con las condiciones de riego pueden ser observadas en el análisis de agrupamiento de las muestras de suelo sin plantar. Por ejemplo, se puede considerar que el tratamiento de suelo sin plantas regado con agua (SW) corresponde a la condición más oligotrófica analizada. En donde la baja disponibilidad de nutrientes puede generar el mantenimiento de una comunidad relativamente indiferenciada, explicando el agrupamiento de las muestras de este tratamiento. En comparación, en el tratamiento de suelo sin planta regado con la solución

nutritiva de Hoagland sin nitrato (SH), el ingreso de otros nutrientes esenciales diferentes al nitrato permitiría la diferenciación de diversos grupos fisiológicos de diazotrofos, produciendo una separación más fuerte de las muestras de este tratamiento en el tiempo. Este postulado se ve reflejado en el análisis de agrupamiento en donde la muestra SHT3 se separó completamente de las restantes muestras, mientras que la muestra SHT2 se diferenció de todas las demás muestras de suelo sin plantar.

Los resultados de la composición del ensamble de diazotrofos mostraron la existencia de bacterias rizobiales (Fig. 21). En estas bacterias, la evolución de la estructura de las poblaciones puede estar influenciada por condiciones ambientales tales como barreras biológicas, aislamiento geográfico, el tipo de suelo o el genotipo de la planta hospedera (Paffeti et al., 1996). Laguerre et al. (2003), mencionan que antes de la infección y la formación de los nódulos, las bacterias rizobiales deben sobrevivir y desarrollarse en el suelo en ausencia de la planta hospedera siendo capaces de crecer de forma saprofitica.

En este contexto, podría esperarse que las poblaciones rizobiales tuvieran un comportamiento similar en los tiempos iniciales de muestreo, independientemente de la presencia de la planta. Sin embargo, los resultados de *nifD* muestran que la persistencia de poblaciones dominantes de rizobia está claramente influenciada por la presencia de la planta incluso en los tiempos iniciales de muestreo.

Experimentos con *R. leguminosarum* en suelo con diferentes coberturas vegetales indica que la presencia y tipo de la planta en el suelo determina la conformación de microhábitats particulares con diferentes capacidades para sustentar el crecimiento microbiano (Mendes & Bottomley, 1998). Asimismo, experimentos de inoculación con *S. meliloti* mostraron que el crecimiento en la rizósfera precede a la dispersión en el suelo (Schewieger & Tebbe, 2000). Los resultados de este trabajo apoyan estas observaciones e indican que la presencia

de la planta huésped (*P. vulgaris*) contribuye a la persistencia de bacterias rizobiales en el suelo a lo largo del tiempo.

El enriquecimiento selectivo de bacterias rizobiales ha sido reportado previamente en trébol, pero en este caso la abundancia relativa de los biotipos en el suelo no se correlaciona con las abundancias observadas en los nódulos (Leung et al., 1994). En contraste, la banda de *nifD* dominante en los patrones de DGGE de amplicones de este gen en las muestras de suelo estuvo presente en todos los nódulos analizados. Estos resultados muestran que la bacteria dominante en el suelo fue correlacionada con la bacteria dominante en los nódulos. Se ha postulado que la abundancia de un tipo particular de rizobios en los nódulos puede ser consecuencia de una mayor abundancia de dicho biotipo en el suelo (Bromfield et al., 1995; Hartmann et al., 1998; Velazquez et al., 1999). Los resultados obtenidos aquí no son concluyentes a este respecto, debido a que la dominancia de un único genotipo en los nódulos puede ser explicada tanto por la alta abundancia en el suelo, como por el enriquecimiento selectivo realizado por el hospedero.

Trabajos previos con un número mayor de nódulos muestra que la variabilidad de las poblaciones microsimbiontes de *Rhizobium* es muy baja (Bromfield et al., 1995), existiendo también evidencias de desequilibrio de ligamiento entre poblaciones a diversidad escalas, sugiriendo una estructura clonal (Souza et al., 1992). Con estos antecedentes no resulta sorpresivo encontrar que las poblaciones analizadas presentaron una baja variabilidad.

Se han publicado estudios de diversidad en otros modelos de simbiosis planta-microorganismo. Por ejemplo, estudios de las poblaciones simbióticas de *Nostoc* y la angiosperma *Gunnera* muestran que existe una reducida variabilidad genética de las poblaciones simbióticas colonizando un único hospedero (Guevara et al., 2002). Este resultado también ha sido observado en otros modelos simbióticos. En *Frankia*, la

diversidad genética de poblaciones microsimbiontes ha mostrado la dominancia de un genotipo particular, el cual es a su vez el miembro dominante de la población en el suelo (Chavez, 2004). Por consiguiente, la dominancia de genotipos bacterianos en los sistemas simbióticos planta-bacteria parece estar ampliamente distribuida.

Diversos aspectos resultan interesantes de la observación de baja variabilidad de las poblaciones microsimbiontes. Podría postularse que existe una alta presión selectiva del hospedero sobre la bacteria asociada; sin embargo, la observación de la presencia del mismo microsimbionte en experimentos de campo, indican que otros procesos pueden estar involucrados en la selección de la bacteria. Por ejemplo la habilidad competitiva de algún biotipo particular para sobrevivir en vida libre, generaría una mayor abundancia de dicho biotipo. También se demostró con anterioridad la presencia y viabilidad de *R. etli* en semillas de *P. vulgaris* (Perez-Ramirez et al., 1998). La dispersión de *R. etli* en las semillas constituye una explicación alternativa a la limitada diversidad genética encontrada en este análisis.

4.6.- Diversidad en los nódulos rizobiales: nuevas perspectivas.

En este trabajo se detectaron diferencias entre el análisis directo de microsimbiontes desde nódulo y cultivos obtenidos desde los mismos. Sin embargo estos resultados pueden corresponder al aislamiento de bacterias saprofitas asociadas a la superficie del nódulo como se ha sugerido previamente en otros sistemas simbióticos (Guevara et al., 2002). Sin embargo, aunque no es posible rechazar la hipótesis de un crecimiento saprofítico, los resultados dejan abierta la posibilidad de la existencia de múltiples cepas presentes de forma simultánea en el mismo nódulo.

Adicionalmente, la detección de otras bacterias no rizobiales asociadas a los nódulos, sugiere que en el nódulo pueden existir otras bacterias en una interacción de tipo comensal con la planta. Estas nuevas interacciones abren la posibilidad de nuevas rutas metabólicas en el nódulo que pueden resultar innovadoras en términos de la utilización del nitrógeno fijado. Por ejemplo, microorganismos relacionados con las secuencias obtenidas en este trabajo han sido asociados con la degradación de aminoácidos, indicando una posible conexión con el metabolismo del nitrógeno.

La observación preliminar de estos microorganismos por FISH, deja abierta la posibilidad de la existencia de bacterias no rizobiales dentro de los nódulos, dando una nueva perspectiva en la investigación microbiológica de la relación simbiótica entre *Rhizobium* y plantas leguminosas.

5. CONCLUSIONES

- La presencia de la planta modifica el contenido de nitrógeno disponible en el suelo y la composición de grupos muy relacionados fisiológicamente como las bacterias oxidadoras de amonio o las bacterias rizobiales dentro del ensamble de diazótrofos.
- La presencia de la planta afecta la fijación de nitrógeno y la desnitrificación.
- En el caso de grupos poco relacionados como la comunidad bacteriana total o el gremio de diazótrofos los cambios en la composición no se relacionan directamente con los tratamientos analizados.
- Los resultados obtenidos con el marcador funcional *amoA* indican que las diferentes condiciones de riego afectan la abundancia de las bacterias oxidadoras del amonio.
- Las bacterias desnitrificantes en el suelo no pudieron ser detectados por los métodos descritos hasta el momento, aunque existe actividad desnitrificante.
- El marcador molecular *nifD* fue específico para bacterias rizobiales.
- El marcador molecular *nifH* permite detectar un espectro más amplio de organismos diazótrofos no relacionados con bacterias rizobiales.
- La población microsimbionte asociada a los nódulos de *P. vulgaris* es poco variable.
- Bacterias no rizobiales se asocian con los nódulos de esta leguminosa.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alef, K. & P. Nannipieri. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. London.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Alzerreca J.J., J.M. Norton & M.G. Klotz. 1999. The *amo* operon in marine, ammonia-oxidizing gamma-proteobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 180:21-29.
- Amman, R.I., L. Kromholz & D.A. Stahl. 1990. Fluorescence-oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
- Amman, R.I., W. Ludwig & K-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Atlas, R.M. & R. Bartha. 2001. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Cuarta edición. Addison Wesley. Madrid.
- Avrahami, S., R. Conrad & G. Braker. 2002. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5685-5692
- Bagwell, C.E., J.R. La Rocque, G.W. Smith, S.W. Polson, M.J. Friez, J.W. Longshore & C.R. Lovell. 2002. Molecular diversity of diazotrophs in oligotrophic tropical seagrass bed communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 113-119.
- Bardgett, R.D., J.L. Mawdsley, S. Edwards, P.J. Hobbs, J.S. Rodwell & W.J. Davies. 1999. Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of template upland grasslands. *Funct. Ecol.* 13 : 650-660.
- Boon, N., W. de Windt, W. Verstraete & E.M. Top. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 101-112.
- Bothe, H., G. Jost, M. Schloter, B.B. Ward & K-P. Witzel. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 673-690.
- Braker G., A. Fesefeldt & K-P. Witzel. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3769-3775.
- Braker G., J. Zhou, L. Wu, A.H. Devol & J.M. Tiedje. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2096-2104.
- Briones A.M., S. Okabe, Y. Umemiya, N-B. Ramsing, W. Reichardt & H. Okuyama. 2003. Ammonia-oxidizing bacteria on root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different rice cultivars. *Plant Soil* 250:335-348.
- Bromfield, E.S.P., L.R. Barran & R. Wheatcroft. 1995. Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*). *Mol. Ecol.* 4:183-188.

- Brosius J., M.L. Palmer, P.J. Kennedy & H.F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:4801-4805.
- Brown, M.M., M.J. Friez & C.R. Lovell. 2003. Expression of *nifH* genes by diazotrophic bacteria in the rhizosphere of short form *Spartina alterniflora*. FEMS Microbiol. Ecol. 43: 411-417.
- Bruns, M.A., J.R. Stephen, G.A. Kowalchuk, J.I. Prosser & E.A. Paul. 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. Appl. Environ. Microbiol. 65:2994-3000.
- Bürgmann, H., F. Widmer, W. Von Sigler & J. Zeyer. 2004. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. Appl. Environ. Microbiol. 70(1):240-7.
- Calvo L. & J. Garcia-Gil. 2004. Use of *amoB* as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria. J. Microbiol. Meth. in press.
- Chain, P., J. Lamerdin, F. Larimer, W. Regala, V. Lao, M. Land, L. Hauser, A. Hooper, M. Klotz, J. Norton, L. Sayavedra-Soto, D. Arciero, N. Hommes, M. Whittaker & D. Arp. 2003. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. J. Bacteriol. 185: 2759-2773.
- Chavez, M. 2004. Diversidad genética de las poblaciones de *Frankia* y de bacterias fijadoras de nitrógeno en la rizósfera de *Colletia hystrix*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. Santiago.
- Clement, B.G., L.E. Kehl, K.L. DeBord & C.L. Kitts. 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFLPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. J. Microbiol. Methods 31:135-142.
- De Boer, W. & G.A. Kowalchuk. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. Soil Biol. Biochem. 33:853-866.
- Fani, R., R. Gallo & P. Lio. 2000. Molecular evolution of nitrogen fixation: the evolutionary history of the *nifD*, *nifK*, *nifE*, and *nifN* genes. J. Mol. Evol. 51:1-11.
- Ferguson, S.J. 1998. Nitrogen cycle enzymology. Curr. Opin. Chem. Biol. 2:182-93.
- Guevara, R., J.J. Armesto & M. Caru. 2002. Genetic diversity of *Nostoc* microsymbionts from *Gunnera tinctoria* revealed by PCR-STR fingerprinting. Microb. Ecol. 44:127-136.
- Hallin, S. & P.E. Lindgren. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65:1652-1657.
- Hartmann, A., J. Giraud & G. Catroux. 1998. Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium*) *meliloti* strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. FEMS Microbiol. Ecol. 25:107-116.
- Head, I.M., W.D. Hiorns, T.M. Embley, A.J. McCarthy & J.R. Saunders. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. J. Gen. Microbiol. 139:1147-1153.
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla & E.M. Wellington. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl. Environ. Microbiol. 63:3233-41.
- Hoagland, D., & D. Arnon. 1950. The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. No. 347.

- Holmes, A.J., A. Costello, M.E. Lidstrom & J.C. Murrell. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* 132:203-208.
- Hommel, N.G., L.A. Sayavedra-Soto & D.J. Arp. 1998. Mutagenesis and expression of *amo*, which codes for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 180:3353-3359.
- Hoshino, T., S. Tsuneda, A. Hirata Y. Inamori. 2003. In situ PCR for visualizing distribution of a functional gene *amoA* in a biofilm regardless of activity. *J. Biotech.* 105:33-40.
- Jenkins, B.D., G.F. Steward, S.M. Short, B.B. Ward & J.P. Zehr. 2004. Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA microarray. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1767-1776.
- Jetten, M.S., M. Wagner, J. Fuerst, M. van Loosdrecht, G. Kuenen & M. Strous. 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:283-288.
- Jetten, M.S.M. 2001. New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems. *Plant Soil* 230:9-19.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K-H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H-P, Koops & M. Wagner. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3042-3051.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpo, H. Tsuruoka, T. Wada, M. Yamada, S. Tabata. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9:189-197.
- Kaplan, C.W., J.C. Astaire, M.E. Sanders, B.S. Reddy & C.L. Kitts. 2001. 16S rDNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in rat faces during ingestion of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1935-1939.
- Kent, A.D. & E.W. Triplett. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:211-36.
- Klotz, M.G. & J.M. Norton. 1995. Sequence of an ammonia monooxygenase subunit A-encoding gene from *Nitrospira* sp. NpAV. *Gene* 163:159-160.
- Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46(1):43-70.
- Kowalchuk, G.A. & J.R. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:485-529.
- Laguerre, G., P. Louvier, M-R. Allard & N. Amarger. 2003. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* Biovar viciae for nodulation of host legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2276-2283.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds). J.Wiley, Chichester.
- Leung, K., F.N. Wanjage & P.J. Bottomley. 1994. Symbiotic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates which represent major and minor nodule-occupying chromosomal types of field-grown subclover (*Trifolium subterraneum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 427-433.

- Limburg, P.** 1996. Molekularbiologische detection des ammoniummonooxygenase gens in kulturen nitrifizierender bacterium und in gewässerproben. Diplomarbeit. Max-Planck Institut für Limnologie. Plön.
- Lovell, C.R., Y.M. Piceno, J.M. Quattro & C.E. Bagwell.** 2000. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3814-3822.
- Lueders, T. & M.W. Friedrich.** 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:320-326.
- Madigan, M., J. Martinko & J. Parker.** 2000. Brock, biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall. Barcelona.
- McCaig, A.E., T.M. Embley & J.I. Prosser.** 1994. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidizers. *FEMS Microbiol. Lett.* 120:363-368.
- McTavish, H., J.A. Fuchs & A.B. Hooper.** 1993. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 175:2436-2444.
- Mendes, I.C. & P.J. Bottomley.** 1998. Distribution of a population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii among different size classes of soil aggregates. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:970-975.
- Mendum, T.A., R.E. Sockett RE & P.R. Hirsch.** 1999. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the beta subdivision of the class proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4155-4162.
- Michotey, V., V. Mejean & P. Bonin.** 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd(1)-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000:1564-1571.
- Muyzer, G. & K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73:127-141.
- Muyzer, G., E.C. de Waal & A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Myers, R.M., T. Maniatis & L.S. Lerman.** 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155:501-527.
- Myrold, D.D.** 1997. Quantification of nitrogen transformations. En: Manual of environmental microbiology. C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach & M.V. Walter, eds. ASM Press. Washington.
- Neef, A.** 1997. Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Doctoral thesis (Technische Universität München).
- Nicolaisen, M.H. & N.B. Ramsing.** 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 50:189-203.
- Nold, S.C., J. Zhou, A.H. Devol & J.M. Tiedje.** 2000. Pacific northwest marine sediments contains ammonia-oxidizing bacteria in the beta subdivision of the proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4532-4535.

- Norton, J.M., J.J. Alzerreca, Y. Suwa & M.G. Klotz. 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 177:139-49.
- Ohkuma, M., S. Noda & T. Kudo. 1999. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11):4926-34.
- Okano, Y., K.R. Hristova, C.M. Leutenegger, L.E. Jackson, R.F. Denison, B. Gebreyesus, D. Lebauer & K.M. Scow. 2004. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. 70:1008-1016.
- Paffetti, D., C. Scotti, S. Gnocchi, S. Fancelli & M. Bazzicalupo. 1996. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2279-2285.
- Pawlowski, K. & T. Bisseling. 1996. Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell.* 8:1899-1913.
- Perez-Ramirez, N.O., M.A. Rogel, E. Wang, J.Z. Castellanos & E. Martinez-Romero. 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*, *FEMS Microbiol. Ecol.* 26:289-296.
- Peters, J.W., K. Fisher & D.R. Dean. 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:335-366.
- Philippot, L., S. Piutti, F. Martin-Laurent, S. Hallet & J.C. Germon. 2002. Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6121-6128.
- Philippot, L. 2002. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1577:355-376.
- Piceno, Y.M. & C.R. Lovell. 2000. Stability in natural bacterial communities. I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microb. Ecol.* 39: 32-40.
- Piceno Y.M., P.A. Noble & C.R. Lovell. 1999. Spatial and temporal assessment of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Microb. Ecol.* 38:157-167.
- Poly, F., L.J. Monrozier & R. Bally. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* 152: 95-103.
- Poly, F., L. Ranjard, S. Nazaret, F. Gourbiere & L.J. Monrozier. 2001. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2255-2262.
- Prieme, A., G. Braker & J.M. Tiedje. 2002. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1893-900.
- Purkhold, U., A. Pommerening-Röser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H-P. Koops & M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5368-5382.
- Purkhold, U., M. Wagner, G. Timmermann, A. Pommerening-Röser & H.P. Koops. 2003. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-

- oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1485-1494.
- Raymond J., J.L. Siefert, C.R. Staples & R.E. Blankenship. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21:541-554.
- Rosado, A.S., G.F. Duarte, L. Seldin & J.D. van Elsas. 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. *Revista de Microbiologia* 28:135-147.
- Rösch, C., A. Mergel & H. Bothe. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3818-3829.
- Rotthauwe, J.H., W. de Boer, W. Liesack. 1995. Comparative analysis of gene sequences encoding ammonia monooxygenase of *Nitrosospira* sp. AHB1 and *Nitrosolobus multiformis* C-71. *FEMS Microbiol. Lett.* 133:131-135.
- Rotthauwe, J.H., K.P. Witzel & W. Liesack. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4704-4712.
- Sanguinetti, C.J., E.D. Neto, A.J.G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated by polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 17:915-918.
- Schwieger, F & C.C. Tebbe. 2000. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*)-linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3556-3565.
- Schleifer K.-H., R. Amann, W. Ludwig, C. Rothmund, N. Springer & S. Dorn. 1992. Nucleic acid probes for the identification and in situ detection of pseudomonads. pp. 127-134. In: *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. Edited by Galli, E., Silver, S. and Witholt, B. Washington. American Society for Microbiology.
- Silyu-Roberts, G. & G. Lewis. 2001. *In situ* analysis of *Nitrosomonas* spp. in wastewater treatment wetland biofilms. *Wat. Res.* 35:2731-39.
- Sinigalliano, C.D., D.N. Kuhn & R.D. Jones. 1995. Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2702-2706.
- Souza, V., T.T. Nguyen, R.R. Hudson, D. Pinero & R.E. Lenski. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:8389-8393.
- Steward, G.F., B.D. Jenkins, B.B. Ward & J.P. Zehr. 2004. Development and testing of a DNA microarray to assess nitrogenase (*nifH*) gene diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1455-1465.
- Suwa, Y., T. Sumino & K. Noto. 1997. Phylogenetic relationships of activated sludge isolates of ammonia oxidizers with different sensitivities to ammonium sulfate. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43:373-379.
- Teske, A., E. Alm, J.M. Regan, S. Toze, B.E. Rittmann & D.A. Stahl. 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* 176:6623-6630.
- Usui, T., I. Koike & N. Ogura. 2001. N₂O production, nitrification and denitrification in an estuarine sediment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52:769-781.
- Utaker J.B. & I.F. Nes. 1998. A qualitative evaluation of the published oligonucleotides specific for the 16S rRNA gene sequences of the ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:72-88.

- Van de Peer Y. & R. De Wachter. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 10:569-570.
- Velazquez, E., P.F. Mateos, N. Velasco, F. Santos, P.A. Burgos, P. Villadas, N. Toro & E. Martínez-Molina. 1999. Symbiotic characteristics and selection of autochthonous strains of *Sinorhizobium meliloti* populations in different soils. *Soil. Biol. Biochem.* 31:1039-1047.
- Voytek, M.A. & B.B. Ward. 1995. Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1444-1450.
- Webster, E.A. & D.W. Hopkins. 1996. Contributions from different microbial processes to N₂O emission from soil under different moisture regimes. *Biology & Fertility of Soils* 22:331-335.
- Webster, G., T.M. Embley & J.I. Prosser. 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of beta-proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:20-30.
- Whitby C.B., J.R. Saunders, R.W. Pickup & A.J. McCarthy. 2001. A comparison of ammonia-oxidiser populations in eutrophic and oligotrophic basins of a large freshwater lake. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 79:179-188.
- Widmer F., B.T. Shaffer, L.A. Porteous & R.J. Seidler. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:374-380.
- Wrage, N. G.L. Velthof, M.L. van Beusichem & O. Oenema. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol. Biochem.* 33:1723-1732.
- Young, J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: G.Stacey, R.H. Burris & H.J. Evans. *Biological nitrogen fixation*. Chapman & Hall Eds. New York.
- Zahran, H.H. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:968-989.
- Zehr, J.P. & B.B. Ward. 2002. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1015-1024.
- Zehr, J.P., E.J. Carpenter & Villareal T.A. 2000. New perspectives on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans. *Trends Microbiol.* 8:68-73.
- Zehr, J.P., B.D. Jenkins, S.M. Short & G.F. Steward. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5:539-554.
- Zehr, J.P., M.T. Mellon & W.D. Hiorns. 1997. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. *Microbiology* 143:1443-1450.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:533-616.