

UCH-FC  
MAG-B  
A 446  
C.1

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**“DIVERSIDAD GENÉTICA Y FUNCIONAL DE LAS COMUNIDADES  
BACTERIANAS DEL SUELO EN BOSQUES DE OLIVILLO Y LAS MATRICES  
XEROFÍTICAS ALEDAÑAS”**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de

**MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Facultad de Ciencias**

Por

**ROMINA LUZ CATALINA ALMASIA CROCE**

**Mayo, 2015**

**Directores de Tesis:**  
**DR. MICHAEL HANDFORD**  
**DRA. JULIETA ORLANDO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE MAGISTER**

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

**ROMINA LUZ CATALINA ALMASIA CROCE**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 1 del mes Abril del año 2015.

**Directores de Tesis:**

Dr. Michael Handford

Dra. Julieta Orlando

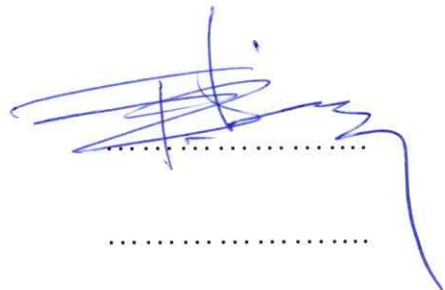
**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

Dr. Francisco Chávez

Dr. Marco Méndez



FACULTAD DE CIENCIAS  
BIBLIOTECA  
CENTRAL  
U. DE CHILE



.....

Dedicado a todos los que participaron de  
mi desarrollo personal y me ayudaron  
a comprender que...

**La claridad solo llega cuando la mente está en silencio**



## Resumen biográfico

Una primaveral tarde del 30 de septiembre de 1987, me cortaron el cordoncito y me dieron las palmaditas necesarias para comenzar a caminar por este mundo. A los pocos meses nos trasladamos con mis padres, Alal Almasia y María de la Luz Croce, y mi hermano Emiliano, a la tierra natal de mi papa, la hermosa Argentina. Crecí en Buenos Aires, rodeada de amigos que conocía desde el jardín y con quienes compartí mi educación básica en el colegio Mariano Acha. Como siempre, una hija muy regalona y desafiada continuamente por las locuras existencialistas y filosóficas de mi hermano mayor. Al comenzar la enseñanza media, por cosas de la vida, me vine a vivir a Chile, a un colegio de niñas muy particular, el Liceo 7 de Providencia. En este periodo nació mi amor por los viajes y las primeras aventuras. Al terminar el colegio, no sabía exactamente que me entretendría más, entonces comencé dos hermosos años de Bachillerato, donde hice grandes amigos que aún me acompañan. Luego, sin estar muy convencida, pero consciente de mi interés por la ciencia y sus aplicaciones, comencé Ing. en Biotecnología Molecular. En la facultad viví muchas experiencias de alegría y angustias, pero más allá de todo conocí gente maravillosa. También durante ese periodo, me las ingenié como pude para poder conocer, y no solo crecer en lo académico, sino también en el mundo, para lo cual viajé y trabajé en programas de "Working Holiday" en EE.UU y Nueva Zelanda. Experiencias únicas y que repetiría mil veces. Hoy, en una nueva etapa y con la mochila llena de conocimientos de la Universidad y de la Vida, camino con mayor certeza en el día a día.

## Agradecimientos

Porque todo lo que hacemos tiene del aporte de todos los que nos acompañaron, en este proceso quiero agradecer a quienes significativamente formaron parte de cada segundo, con una palabra de aliento, de paz, de presión y de diferentes maneras dieron forma a lo que hoy se consolida en estas páginas.

Comenzando por mi madre, porque es la mejor y porque siempre hay una sonrisa en su cara. A mi padre, que me inculcó las ganas de investigar y me apoya desde alguna parte del universo. A mis queridos tíos (Ceci, Ali, Max y Oscar), que me han apoyado siempre, además de enseñarme el enorme valor que tiene la familia. A mi hermano que adoro con todo mi corazón y me recuerda la libertad. A mis amigos de "Bachi", "Biotec" y amigos de la vida que acompañaron y alegraron este camino y muchos momentos.

A la comunidad del Centro de Biología Molecular Vegetal, mis compañeros de laboratorio, al Seba y la Ange, porque son un grupo excepcional, gracias por su apoyo y momentos lindos. Al lab de Ecología Microbiana, sus alumnos, Juanita y Profes, porque me acogieron en su laboratorio y por enseñarme siempre con la mejor disposición, son los más simpáticos del mundo. A Pablo por acompañarme en largas noches de estudio y animarme siempre a darle fin a esta Tesis!

A mis tutores, Profes Julieta y Michael, por creer en mí y apoyar esta tesis de principio a fin, fuera de cualquier proyecto, con toda la buena disposición siempre.

A CONICYT VIU y CONAF porque fueron fundamentales para el desarrollo práctico de esta tesis. Al profesor Dr. Rubén Polanco de la Universidad Andrés Bello por prestarnos Quitinasas.

A la increíble oportunidad de trabajar con el profesor Ramón Rosselló-Mora en el IMEDEA en Palmas de Mallorca, a sus alumnos y visitas (Xisca, Princess, Nayaret, Sara y muchos más) que hicieron de dicha oportunidad una experiencia única, un agradecimiento especial a Raul y Tomeu por enseñarme siempre con la mejor de las disposiciones y acompañarme en todas. A mis *roommate* Teresa, Ana y sus amigas. ... y a todos lo que han estado presentes y ausentes, porque si no fuera por ustedes no habría conseguido todo esto...

## Indice

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. DIVERSIDAD BACTERIANA: APROXIMACIONES PARA SU MEDICIÓN	1
1.2. BIOGEOGRAFÍA MICROBIANA: CONDICIONES AMBIENTALES ACTUALES Y EVENTOS HISTÓRICOS	5
1.3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	12
1.4. OBJETIVOS	12
1.4.1. OBJETIVO GENERAL	12
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
2.1. ÁREAS DE ESTUDIO Y RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO	13
2.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS EDÁFICOS	15
2.3. COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES EDÁFICAS A TRAVÉS DE UNA COLECCIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES	16
2.3.1. COLECCIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES	16
2.3.2. PROSPECCIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO DE LAS COLONIAS BACTERIANAS AISLADAS	17
2.3.3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN DEL RRNA 16S DE LAS COLONIAS BACTERIANAS AISLADAS	18
2.4. COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES EDÁFICAS A TRAVÉS DE LA CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS	20
2.4.1. OBTENCIÓN DE DNA DESDE LAS MUESTRAS DE SUELO Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN DEL RRNA 16S	20
2.4.2. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN	20
2.5. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE COMPOSICIÓN	22
2.5.1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DEL MARCADOR RRNA 16S	22
2.5.2. ESTIMACIÓN DE LA COBERTURA ALCANZADA MEDIANTE LAS APROXIMACIONES DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO	22
2.6. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS COMUNIDADES A TRAVÉS DEL POLIMORFISMO EN EL LARGO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN TERMINALES (TRFLP)	23
2.6.1. OBTENCIÓN DE DNA DESDE LAS MUESTRAS DE SUELO Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN DEL RRNA 16S	23
2.6.2. RESTRICCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	23
2.6.3. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE TRFLP	24
2.7. ESTRUCTURA METABÓLICA DE LAS COMUNIDADES A TRAVÉS DE LOS PERFILES METABÓLICOS A NIVEL COMUNITARIO (CLPP)	25

2.7.1. OBTENCIÓN DEL INÓCULO MICROBIANO Y MEDICIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO	25
2.7.2. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE CLPP	26
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	27
2.9. ANÁLISIS MULTIVARIADOS	27
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>3.1. ANÁLISIS DE PARÁMETROS EDÁFICOS</b>	<b>29</b>
<b>3.2. COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EDÁFICAS</b>	<b>31</b>
3.2.1. CONSTRUCCIÓN DE UNA COLECCIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES Y SELECCIÓN DE AISLADOS CON PROPIEDADES ANTAGÓNICAS	31
3.2.2. COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES EDÁFICAS DETERMINADA MEDIANTE LA COLECCIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES Y LA CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS GÉNICAS	37
3.2.3. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EDÁFICAS Y GEOGRÁFICAS SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EDÁFICAS	47
<b>3.3. ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EDÁFICAS</b>	<b>51</b>
3.3.1. POLIMORFISMO EN EL LARGO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN TERMINALES (TRFLP)	51
3.3.2. PERFILES METABÓLICOS A NIVEL COMUNITARIO (CLPP)	53
3.3.3. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EDÁFICAS Y GEOGRÁFICAS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS	58
<b>3.4. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EDÁFICAS Y GEOGRÁFICAS SOBRE LA DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EDÁFICAS</b>	<b>62</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>4.1. VARIABLES EXPLICATIVAS: FACTORES EDÁFICOS Y GEOGRÁFICOS</b>	<b>66</b>
<b>4.2. DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EDÁFICAS: COMPOSICIÓN DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE CULTIVO</b>	<b>68</b>
<b>4.3. DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EDÁFICAS: ESTRUCTURA GENÉTICA Y METABÓLICA</b>	<b>75</b>
<b>4.4. DIVERSIDAD BACTERIANA E INFLUENCIA GEOAMBIENTAL</b>	<b>79</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>82</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>83</b>
<b>7. ANEXOS</b>	

## Lista de Tablas

- Tabla 1.** *Coordenadas geográficas y altura en torno a las cuales se llevó a cabo el muestreo.* \_\_\_\_\_ 13
- Tabla 2.** *Parámetros del ajuste de las curvas de rarefacción y cálculo de la cobertura de las colonias de bacterias aisladas y los clones de las genotecas.* \_\_\_\_\_ 38
- Tabla 3.** *Coefficientes de redundancia de las variables explicativas (edáficas y geográficas) para los dos primeros ejes (RDA1 y RDA2) del ordenamiento basado en la composición de colonias y clones determinada utilizando el marcador 16S RNA.* \_\_\_\_ 50
- Tabla 4.** *Índices de diversidad ( $\pm$  error estándar) calculados utilizando los datos de los TRFs (pares de bases y fluorescencia) para cada una de las comunidades.* \_\_\_\_\_ 53
- Tabla 5.** *Índices de diversidad ( $\pm$  error estándar) calculados utilizando los valores de absorbancia detectados a las 72 horas de incubación de las comunidades en presencia de cada una de las fuentes de carbono.* \_\_\_\_\_ 58
- Tabla 6.** *Coefficientes de redundancia de las variables explicativas (edáficas y geográficas) para los dos primeros ejes (RDA1 y RDA2) del ordenamiento basado en la estructura genética y metabólica determinada utilizando TRFLP y CLPP, respectivamente.* \_\_\_\_\_ 61
- Tabla 7.** *Coefficientes de redundancia de las variables explicativas (edáficas y geográficas) para los dos primeros ejes (RDA1 y RDA2) del ordenamiento basado en la diversidad (estructura y composición) de las comunidades bacterianas.* \_\_\_\_\_ 64



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Modelo de agrupamiento de las muestras según diferentes hipótesis de la biogeografía microbiana. _____	8
<b>Figura 2.</b> Recolección de las muestras de suelo. _____	14
<b>Figura 3.</b> Distribución de las 31 fuentes de carbono dispuestas en triplicado en las placas Ecoplate™ (BIOLOG®). _____	26
<b>Figura 4.</b> Parámetros edáficos medidos en las muestras de suelo. _____	30
<b>Figura 5.</b> Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas obtenidas en los medios de cultivo LB (copiotrófico, arriba) y R2A (oligotrófico, abajo). _____	32
<b>Figura 6.</b> Muestrario del tipo de colonias de las bacterias aisladas en los medios LB (copiotrófico) y R2A (oligotrófico). _____	33
<b>Figura 7.</b> Medición de propiedades antagónicas de las colonias de bacterias aisladas. _____	35
<b>Figura 8.</b> Agrupamiento de las secuencias del gen del rRNA 16S obtenidas desde las colonias de bacterias con actividad antagónica y desde las bases de datos SILVA y LTP. El árbol se generó utilizando el método de corrección de Jukes & Cantor y la topología se infirió mediante el algoritmo de Neighbor Joining. _____	41
<b>Figura 9.</b> Agrupamiento de las secuencias del gen del rRNA 16S obtenidas desde las colonias de bacterias con actividad antagónica, desde los clones de las librerías génicas y desde las bases de datos SILVA y LTP. El árbol se generó utilizando el método de corrección de Jukes & Cantor y la topología se infirió mediante el algoritmo de Neighbor Joining. _____	43
<b>Figura 10.</b> Abundancia relativa de cada grupo bacteriano (filos y clases) medida a partir de la identificación de las OPUs de los clones (izquierda) y las colonias (derecha) obtenidos desde las comunidades edáficas. _____	44
<b>Figura 11.</b> Diagramas de Venn realizados con el número de OPUs determinadas a partir de los clones (arriba) y colonias (abajo) en el análisis de composición de las comunidades bacterianas. _____	46
<b>Figura 12.</b> Análisis de redundancia (RDA) entre la composición taxonómica de las comunidades bacterianas y las variables explicativas (edáficas y geográficas) seleccionadas. _____	49
<b>Figura 13.</b> Partición de la variación de la composición determinada por la influencia de variables edáficas (ambiental) y geográficas (espacial). _____	51

- Figura 14.** Abundancia relativa de la fluorescencia de cada TRF obtenido desde las comunidades muestreadas. Se indica en la figura la enzima de restricción utilizada para cada perfil obtenido (A, AluI; H: HaeIII). \_\_\_\_\_ 52
- Figura 15.** Cinéticas metabólicas a partir de las mediciones de absorbancia producida por la utilización de las fuentes de carbono en las placas Ecoplate™ (BIOLOG®) inoculadas con una suspensión de las muestras de suelo. \_\_\_\_\_ 54
- Figura 16.** Parámetros cinéticos de las curvas medidas para las comunidades edáficas, según el ajuste a la ecuación de Gompertz modificada. \_\_\_\_\_ 55
- Figura 17.** Consumo de fuentes de carbono clasificadas por categoría por parte de las comunidades edáficas. \_\_\_\_\_ 57
- Figura 18.** Análisis de redundancia (RDA) entre la estructura de las comunidades bacterianas y las variables explicativas (edáficas y geográficas) seleccionadas. \_\_\_\_ 60
- Figura 19.** Partición de la variación de la estructura determinada por la influencia de variables edáficas (ambiental) y geográficas (espacial). \_\_\_\_\_ 62
- Figura 20.** Análisis de redundancia (RDA) entre la diversidad (estructura y composición) de las comunidades bacterianas y las variables explicativas (edáficas y geográficas) seleccionadas. Los gráficos corresponden a los datos de composición (clones+colonias) y de estructura (TRFLP+CLPP). \_\_\_\_\_ 63
- Figura 21.** Partición de la variación de la diversidad determinada por la influencia de variables edáficas (ambiental) y geográficas (espacial). \_\_\_\_\_ 65

## Lista de Símbolos, Abreviaturas o Nomenclaturas

CCA	Canonical correspondence analysis (Análisis de correspondencia canónica)
CFU	Colony forming unit (Unidad formadora de colonia)
CH	Contenido hídrico
CLPP	Community-level physiological profiling (Perfil fisiológico a nivel comunitario)
CONAMA	Comisión Nacional de Medio Ambiente
CO	Colonias (co)
CL	Clones (cl)
C/N	Relación Carbono/Nitrógeno
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FJM	Matriz del Parque Nacional Fray Jorge
FJB	Bosque del Parque Nacional Fray Jorge
HCN	Ácido cianhídrico
Lat	Latitud
Lon	Longitud
MO	Materia orgánica
Nitrato	Contenido de nitrato
Amonio	Contenido de amonio
N <sub>i</sub>	Nitrógeno inorgánico
OPU	Operational phylogenetic unit (Unidades filogenéticas operacionales)
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PH	Peso húmedo
PS	Peso seco
p/v	Peso/Volumen
RDA	Análisis de redundancia
rRNA 16S	Marcador molecular correspondiente al gen del DNA ribosomal 16S
SIM	Matriz del Cerro Santa Inés
SIB	Bosque del Cerro Santa Inés
SNASPE	Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado

TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TRFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)
TRF	Terminal restriction fragment (Fragmento terminal de restricción)
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UF	Unidades de fluorescencia
v/v	Volumen/volumen
6-FAM	6-carboxifluoresceína

## Resumen

Las comunidades de áreas fragmentadas de bosques de olivillos pertenecen a una comunidad que se extendió en forma continua en la costa de Chile central durante la última edad glacial del Pleistoceno. Actualmente, debido a la separación geográfica de los fragmentos, estas áreas poseen un contraste climático, de propiedades edáficas y de composición florística único, que generan condiciones que impactarían directamente a la microbiota del suelo. Considerando las interesantes condiciones encontradas en estos suelos, y con el objeto de evaluar hipótesis biogeográficas, se analizaron las comunidades bacterianas de los suelos del bosque interior y el matorral aledaño al relicto (hábitats) del Parque Nacional Fray Jorge y al relicto del Cerro Santa Inés (regiones), separados por 200 km, los que corresponden a suelos que han mantenido características únicas a lo largo de los años, conservando especies como fósiles vivientes que forman parte del patrimonio biológico nativo.

En cada sitio de estudio se determinaron variables físico-químicas del suelo y coordenadas geográficas de los puntos de muestreo. Asimismo, mediante un enfoque polifásico, se combinaron aproximaciones dependientes e independientes de cultivo para abarcar un mayor espectro de la diversidad bacteriana de los sitios analizados. Para ello se determinó la composición (prospección de bacterias aisladas, con potenciales propiedades antagónicas, y librerías génicas a partir de DNA extraído directamente del suelo) y la estructura (técnicas de *fingerprinting* a nivel genético, TRFLP, y metabólico, CLPP) de las comunidades bacterianas presentes en los suelos de los bosques y las matrices adyacentes de ambos sitios.

Las principales diferencias entre bosques y matrices se detectaron en los parámetros edáficos, observándose un menor pH, y mayores porcentajes de contenido

hídrico y materia orgánica en los primeros. Al estimar la composición dependiente e independiente de cultivo de las comunidades bacterianas, se detectaron diferencias entre las comunidades de los diferentes hábitats y regiones, siendo más similares entre sí las comunidades de los bosques al utilizar el segundo enfoque. En cuanto a la estructura, las comunidades de bosques se diferenciaron de las de las matrices tanto a nivel genético como metabólico, aunque los bosques presentaron una estructura metabólica muy similar entre sí.

Tras estimar la diversidad genética y metabólica de las comunidades bacterianas de los suelos de los bosques del interior de los relictos y de las matrices no boscosas adyacentes, y al determinar los efectos de los parámetros edáficos y las variables geográficas, se observó que tanto los factores abióticos del suelo como los eventos pasados debido a la conexión histórica de los bosques, modelan la estructura de las comunidades bacterianas estudiadas.

## **Abstract**

The communities of fragmented forest of Olivillo belong to a community that continuously spread on the coast of central Chile during the last ice age of the Pleistocene. Currently, due to geographical separation of the fragments, these areas have a contrasting climate and soil properties, as well as unique floral compositions that create conditions that could impact directly on the soil microbiota. Considering the interesting conditions found in these soils, and in order to assess biogeographic hypothesis, we studied the bacterial soil communities of the sectors of the inner forest and adjacent matrix (habitats) of relicts in Fray Jorge National Park and in Cerro Santa Ines (regions), separated by 200 km, which correspond to soils that have retained unique features over the years, preserving species and living fossils that are part of the native biological heritage.

In each study site, soil physicochemical properties and geographical coordinates of the sampling points were determined. Additionally, using a multiphasic strategy, culture dependent and independent approaches were combined to cover a wider spectrum of bacterial diversity of the sites analyzed. To do so, the composition (by means of prospecting isolated bacteria with potential antagonistic properties, and generating gene libraries from DNA extracted directly from the soil) and structure (using genetic (TRFLP) and metabolic (CLPP) fingerprinting techniques) of the bacterial communities present in forest and adjacent matrix soils were determined for both sites.

The main differences between forests and matrices were detected in the soil parameters; specifically, a lower pH, and higher percentages of water content and organic matter were observed in the former. In estimating the culture dependent and independent composition of the bacterial communities, differences were detected

between communities of different habitats and regions, being more similar to each other the forest communities when using the second approach. As for the structure, forest communities differed from those of the matrix at the metabolic and genetic level, although metabolically, the forest communities were very similar to each other.

After estimating the metabolic and genetic diversity of bacterial communities of forest soils inside relict and in the adjacent non-forest matrix, and on determining the effects of soil parameters and geographical variables, it was observed that both current abiotic soil factors as well as past events due to the historical connection of forests, have modeled the structure of the bacterial communities studied.



# 1. Introducción

## 1.1. Diversidad bacteriana: aproximaciones para su medición

Las bacterias surgen aproximadamente hace 3,8 mil millones de años; son microscópicas, morfológicamente simples y están distribuidas ampliamente en una gran variedad de ambientes, incluyendo aquellos más extremos (Pontes y col., 2007). Éstas han sido descritas como una de las formas de vida más diversas en la Tierra, compuestas por más de 1 millón de especies (American Society for Microbiology, 1994). Consistente con ello, se ha observado que todas las formas de vida requieren de procesos bacterianos para poder sobrevivir, observándose que la diversidad de las bacterias es mayor que la diversidad de cualquier otro grupo de organismos (Kennedy, 1999). Más aun, éstas son responsables de una gran variedad de procesos bioquímicos necesarios para sostener la vida en la Tierra. Interesantemente, solo una fracción de la diversidad bacteriana ha sido descrita y apenas entre el 1-10% han sido caracterizadas o cultivadas en colecciones, dejando una vasta porción sin conocer (Hawksworth, 1991; Amman y col., 1995; Kennedy, 1999).

El conocimiento limitado de la diversidad bacteriana se da principalmente por limitaciones taxonómicas y metodológicas asociadas al estudio de estos organismos (Kirk y col., 2004). Esto último, se debe principalmente a que la mayoría de las bacterias no han podido ser aisladas o cultivadas con las técnicas comunes y que durante los últimos 100 años, los microorganismos han sido descritos e identificados mediante metodologías dependientes de cultivo.

Los sesgos de las metodologías dependientes de cultivo se dan principalmente porque solo un porcentaje menor de las bacterias son cultivables con los métodos

microbiológicos tradicionales (Campbell y Greaves, 1990). Ha sido ampliamente descrito que el medio de cultivo y las condiciones de incubación utilizados seleccionan a las bacterias, principalmente porque: i) no se conocen las condiciones de cultivo más adecuados; ii) poseen interacción obligatoria con otros organismos; o iii) están presentes en estados no cultivables. Por lo anterior, se deben escoger condiciones que permitan disminuir en parte dicho sesgo, escoger las condiciones más adecuadas si se desea seleccionar algún grupo en particular de microorganismos o las condiciones menos restrictivas si se busca rescatar una amplia gama de grupos (Felske y col., 1998; Kaiser y col., 2001).

Durante las últimas dos décadas han surgido herramientas moleculares basadas en la secuenciación del DNA y el análisis de marcadores moleculares, que han permitido obtener información de las relaciones filogenéticas, los roles ecológicos y la evolución de las bacterias, incluso de bacterias que no pueden ser cultivadas. Los últimos avances, han dejado en descubierto la enorme diversidad de microorganismos y su enorme potencial, considerando sus múltiples funciones como reguladores de los ciclos bio-geo-químicos, el potencial de bio-remediación, la catalización de procesos mediante múltiples enzimas y la capacidad de síntesis de productos naturales útiles en procesos industriales y médicos, entre otras (Pontes y col., 2007).

Sin embargo, los estudios de diversidad bacteriana han mostrado que no solo están sesgados cuando únicamente se incluyen análisis dependientes de cultivos; se ha observado que muchas bacterias aisladas por metodologías dependientes de cultivo no se encontraban representadas en librerías génicas (colecciones de clones), demostrando que una parte significativa de la diversidad es dejada de lado si se analiza exclusivamente mediante aproximaciones independientes de cultivo (Pedró-Alió, 2006; Donachie y col., 2007). Algunas aproximaciones independientes de cultivo

se basan por ejemplo en el análisis de ácidos nucleicos, principalmente en la secuenciación de marcadores como el gen del RNA ribosomal 16S (rRNA 16S), debido a que presenta ubicuidad, baja tasa de transferencia horizontal y diferentes tasas de variación; aunque también pueden utilizarse marcadores de genes específicos que permiten identificar grupos funcionales (Bustamante y col., 2012; Orlando y col., 2012). Asimismo, pueden utilizarse técnicas de *fingerprinting* para resolver los marcadores moleculares amplificados, como por ejemplo a través de las técnicas de la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE; Muyzer y col., 1993) y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP; Liu y col., 1997). Al comparar estas técnicas, se ha demostrado que proveen de resultados similares en la determinación de la estructura de comunidades bacterianas de diferentes suelos y que sus patrones se correlacionan con las características bióticas y abióticas del suelo (Smalla y col., 2007). Las distorsiones en los resultados debidas al uso de enfoques moleculares pueden deberse a la lisis celular, la extracción de DNA, la especificidad en la amplificación de los marcadores moleculares, el número de copias del marcador seleccionado, la presencia de sustancias inhibitorias de las reacciones necesarias para la aproximación a utilizar, entre otros factores (Kaiser y col., 2001).

En la búsqueda por superar estas dificultades, se han desarrollado enfoques polifásicos que combinan técnicas de biología molecular, métodos microbiológicos y análisis geoquímicos que permiten comprender la interacción de los microorganismos con su ambiente natural y así abordar en mayor profundidad el tema de la diversidad microbiana (Jain y col., 2005). Con este enfoque, la caracterización de comunidades microbianas del suelo han incluido tanto técnicas dependientes de cultivo a través del uso de diversos medios selectivos, como técnicas independientes de cultivo a través

del análisis de ácidos nucleicos (e.g. Widmer y col., 1999; D'Ambrosio y col., 2014), perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) (e.g. Zelles y Bai, 1993; Bodelier y col., 2009) o perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP) (e.g. Garland y Mills, 1991; Foley y col., 2008).

Existe una amplia diversidad de microorganismos que pueden ser identificados desde el suelo por aproximaciones tanto dependientes como independientes de cultivo; pero sólo aquellos que son recuperados en medios de cultivo pueden ser utilizados como una fuente de productos naturales y utilizarse en la industria. Entre los productos de interés biotecnológico, los más conocidos son los antibióticos, los biocatalizadores (Daniel, 2004) y los biocontroladores, entre otros. En este contexto, en las últimas décadas el interés por el rol de los microorganismos y la importancia de su interacción con las plantas ha ido en aumento en todas las áreas, destacando la inclusión en la agricultura que principalmente se debe a que existen microorganismos beneficiosos que se han destacado por sus importantes aplicaciones en sanidad y estimulación vegetal (Gerhardson, 2002). Varios estudios se han desarrollado, en los que una gran cantidad de géneros de bacterias han sido evaluados por sus interesantes propiedades, entre ellos *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, y *Thiobacillus* (Raaijmakers y col., 2002). Se han descrito diferentes mecanismos en estas bacterias que mejoran la calidad de las plantas mediante, por ejemplo, el control de fito-patógenos del suelo a través de la producción de compuestos antifúngicos, como quitinasas y cianuro, o mediante la competencia por nutrientes como el hierro (i.e. producción de sideróforos) (Fravel., 1988; Nautiyal, 1999; Kannapiran y Ramkumar, 2011; Verma y col., 2012; Kuddus y Ahmad, 2013). Sin embargo, se ha descrito que no todos los aislados tienen

el mismo grado de antagonismo frente a patógenos (Mushtaq y col., 2010) y respecto a ello, poco se conoce acerca de la frecuencia y ecología de estas bacterias en determinados suelos, por lo que conocer sobre ello podría ayudar a identificar nuevas variedades que se adapten mejor a suelos específicos (Raaijmakers y col., 2002).

Por lo anteriormente expuesto, en esta tesis se propone analizar la diversidad microbiana utilizando metodologías complementarias que nos permitan rescatar una mayor fracción de la diversidad, abarcando tanto la composición (identidad de los grupos taxonómicos) como la estructura (riqueza y abundancia de los grupos bacterianos) de la comunidad, para lo cual se incluyen análisis moleculares y funcionales buscando abarcar bacterias tanto cultivables como no cultivadas.

## **1.2. Biogeografía microbiana: condiciones ambientales actuales y eventos históricos**

El ecólogo Robert May en 1992 destacaba: "Tenemos un catálogo de todos los cuerpos celestiales que nuestros instrumentos pueden detectar, pero ignoramos cuántos seres vivos están compartiendo la Tierra con nosotros" (Pedró-Alió, 2006).

Clásicamente se ha propuesto para la biogeografía de bacterias, que los microorganismos son cosmopolitas y que: "Todo está en todas partes, pero el medio ambiente selecciona" (Baas Becking, 1934). En ese contexto, se ha propuesto la hipótesis de la heterogeneidad del hábitat, que postula que un hábitat estructuralmente más complejo y heterogéneo es capaz de ofrecer recursos para un mayor número de especies (Grez y col., 2007). Trabajos en cianobacterias (García-Pichel y col., 1996) y bacterias provenientes de sedimentos marinos (Bowman y McCuaig, 2003), entre otros, avalan esta hipótesis. Sin embargo, también se ha propuesto que la distribución

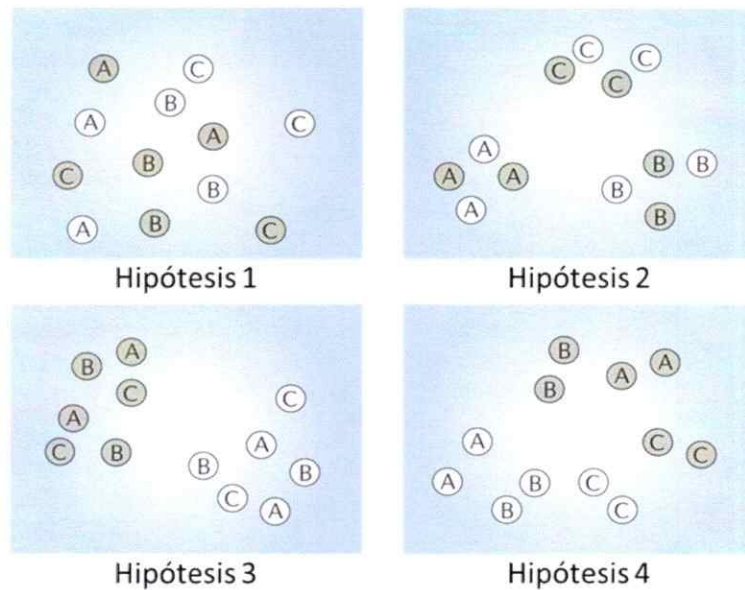
de los microorganismos responde a eventos históricos como consecuencia de su capacidad de dispersión y colonización limitadas (Fierer, 2008). Otros investigadores señalan que tanto la heterogeneidad espacial como las limitaciones a la dispersión darían explicación a los patrones de diversidad geográfica de la microbiota, indicando que hay factores históricos y factores ambientales contemporáneos responsables de la distribución de ésta (Martiny y col., 2006; Hanson y col., 2012).

Por lo tanto, aunque el ambiente seleccione, existe evidencia de que no todo está en todas partes, existiendo por ende una biogeografía de microorganismos (Martiny y col., 2006; Hanson y col., 2012). Una de las evidencias que avala la existencia de patrones de distribución biogeográfica de microorganismos, es la existencia de endemismo (Fulthorpe y col., 1998; Cho y Tiedje, 2000; Pagaling y col., 2009; McAllister y col., 2011), que por definición corresponde a un taxón que está restringido a un lugar, región o hábitat determinado. El endemismo es una manifestación clara de biogeografía microbiana, tal como se ha observado en macroorganismos (Hanson y col., 2012). Otra evidencia son las relaciones no aleatorias de los taxones a través de un paisaje, es decir, la detección de patrones de similitud genética entre los taxones microbianos en diferentes lugares y la correlación con la distancia geográfica. Estas relaciones asociadas a cambios en distancia geográfica se han observado para microorganismos en una gama de hábitats en varios niveles taxonómicos (Shaffer y col., 2000; Green y col., 2004; Horner-Devine y col., 2004; Casteleyn y col., 2010). Sin embargo, no se descarta la existencia de taxones que poseen una distribución cosmopolita (Pommier y col., 2007).

Se han explorado diversos factores que contribuirían a generar patrones de biogeografía en el largo plazo, entre los que se consideran las mutaciones, la selección, la deriva y el flujo génico (Hanson y col., 2012). Sumado a ello, también se

han descrito factores contemporáneos que influyen en la composición y la estructura microbiana, como lo son las características edáficas. Entre los estudios examinados por Hanson y col. (2012), la selección contemporánea tuvo un mayor efecto sobre la diversidad microbiana que los procesos históricos. Algunos estudios determinaron como mejores descriptores de la diversidad bacteriana al pH (Fierer y Jackson, 2006), a la disponibilidad de amonio (Avrahami y col., 2002) y a la relación C/N (Zhang y col., 2006), entre otros.

Martiny y col. (2006), en una revisión de lo propuesto respecto a biogeografía de microorganismos se plantearon la pregunta de si las diferencias en la diversidad microbiana entre hábitats y regiones se deben a condiciones ambientales actuales, a eventos históricos o a ambos. Para ello, utilizando un modelo en el que incluyeron dos regiones y tres hábitats, plantearon 4 posibles escenarios que conducen a diferentes agrupamientos de las muestras (Figura 1), y los enunciaron como hipótesis: 1) los microorganismos se distribuyen al azar; 2) los microorganismos son cosmopolitas, el ambiente selecciona y por ende se consideran determinantes las condiciones actuales; 3) la distribución actual es producto de eventos históricos; y 4) la distribución estaría determinada por eventos pasados y condiciones ambientales contemporáneas.



**Figura 1.** Modelo de agrupamiento de las muestras según diferentes hipótesis de la biogeografía microbiana. Círculos blancos y verdes representan regiones geográficas. A, B y C representan hábitats diferentes. Ver explicación de las hipótesis en el texto (Imagen modificada de Martiny y col., 2006).

Según declara Fierer (2008), hay una dificultad intrínseca en la búsqueda de hábitats similares, pero separados espacialmente que permitan analizar las hipótesis anteriormente mencionadas. Afortunadamente en Chile, se encuentran una gran variedad de ambientes y condiciones climáticas que generan espacios ideales para el análisis de la biogeografía de diversos organismos, ya que su gran diversidad de hábitats, sumado al clima templado y relativo aislamiento geográfico, ha favorecido el desarrollo de una biodiversidad moderada en número, pero con especies y ecosistemas únicos (Gajardo, 1994; Dinerstein y col., 1995). La Comisión Nacional de Medio Ambiente (CONAMA), afirma que la biodiversidad de flora y fauna del país muestra altos niveles de endemismo y especies nativas, por lo que es particularmente valioso e importante preservar estos ecosistemas (CONAMA, 2008). Desde el sur al norte incluyen: los bosques lluviosos tipo norpatagónico y valdiviano, el bosque



esclerófilo y los matorrales del área de clima mediterráneo de Chile central, los desiertos de lluvia de invierno del norte chico, y la flora alto-andina que se desarrolla por sobre la línea arbórea o su equivalente fitogeográfico en la cordillera de los Andes y en la cordillera de la Costa (Arroyo y col., 2008).

Dentro de los bosques mencionados anteriormente se encuentran los ecosistemas chilenos más enigmáticos: los denominados bosques relictos de la cordillera de la Costa. Éstos corresponden a fragmentos remanentes de bosques de olivillos (*Aextoxicon punctatum* Ruiz et Pav.) pertenecientes a una comunidad que se extendió en forma continua en la costa de Chile central (30°S - 42°S) durante la última edad glacial del Pleistoceno (2,6 millones de años antes del presente) (Villagrán y cols, 2004).

Se propone que los relictos discontinuos del norte chico y el extremo sur del país mantienen en la actualidad características vegetacionales y edáficas muy similares. En el extremo norte de su distribución (Parque Nacional Fray Jorge, 30°S; y Cerro Santa Inés, 32°S) estos ecosistemas se caracterizan en general por poseer zonas de bosque higrófilo presentes en lo alto de los cerros de la cordillera de la Costa, con alta humedad relativa y baja oscilación térmica; mientras que las matrices aledañas poseen matorral xerófito con menor influencia de neblina, altas temperaturas y menor humedad relativa (Pérez, 1994; Francois, 2004).

De acuerdo con los estudios geológicos y paleoclimáticos, se ha propuesto que estos ambientes se formaron en climas subtropicales y que, producto de la aridización climática paulatina desde el Terciario (>5 millones de años antes del presente), fueron remplazados por comunidades de matorral xerófito. Los sucesivos períodos húmedos glaciares y los periodos interglaciares secos del Cuaternario (2 millones de años antes del presente) influyeron en la expansión y la contracción de esta comunidad. Así,

durante el Holoceno (11,8 miles de años antes del presente), con el aumento de la desertificación, los bosques fueron desestructurados en parches, dejando estos ecosistemas como verdaderos fósiles vivientes mantenidos por la niebla costera en la cima de los cerros y rodeados de vegetación xerofítica (Villagrán y col., 2004).

El contraste producido naturalmente en estas comunidades de áreas fragmentadas de bosque que poseen un contraste climático, edáfico y de composición florística únicos, generan condiciones micro-climáticas que afectan las propiedades físico-químicas del suelo (Burke, 2003), y como se ha descrito anteriormente, los cambios en las propiedades edáficas impactan directamente a la microbiota del suelo (Reyes y col., 2011). Por lo anterior, es que se propone estudiar la microbiota de los sectores del bosque interior y el matorral aledaño al relicto del parque nacional Fray Jorge y al relicto del cerro Santa Inés, esperando encontrar mayores diferencias en la diversidad bacteriana entre bosques y matorrales que al comparar bosques o matorrales entre sí.

Sin embargo, y a pesar de las semejanzas ambientales presentes en los bosques, no se espera que la microbiota de éstos sea tan similar, ya que los bosques escogidos en este estudio presentan características que podrían resultar relevantes y generar cambios en las comunidades microbianas a pesar de que se encuentran distanciados solo por 200 km. El bosque relicto presente en el parque nacional Fray Jorge se encuentra situado en la ladera poniente de la cordillera de la Costa y está protegido por el Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado (SNASPE) desde 1941; mientras que el relicto presente en el cerro Santa Inés está situado en la ladera oriente y ha sido fuertemente intervenido por el hombre, presentando un alto riesgo de deterioro principalmente por la instalación de antenas telefónicas, caminos abiertos al público y zonas que se han transformado en basurales clandestinos (Squeo y col., 2001). Este último bosque es considerado un sitio prioritario para la conservación de

especies de la flora, vulnerables y en peligro de extinción, pero sólo desde el año 2013 se ha trabajado en acciones concretas de protección tras ser adquirido por la Minera Los Pelambres (Riffo, C., 2014).

Cabe mencionar que en el año 2007 se compararon las comunidades bacterianas presentes tanto en el bosque como en la matriz de dos bosques relictos separados por 1500 km, el presente en el Parque Nacional Fray Jorge y en la Isla Guafo, concluyendo que las comunidades bacterianas de los bosques presentaron mayor similitud entre sí que al compararlas con las comunidades de las matrices adyacentes, sugiriendo que su estructura y composición responden a factores actuales principalmente, aun cuando factores históricos también pueden influir (Guevara y col., 2007). En este trabajo se analizará si el comportamiento de las comunidades bacterianas de bosques relictos y sus matrices adyacentes separados por 200 km responde a dicha condición o a otros factores.

### **1.3. Hipótesis de trabajo**

Las comunidades bacterianas edáficas presentes en el Parque Nacional Fray Jorge y el Cerro Santa Inés, dos regiones geográficas separadas por 200 km y ambas con los hábitats de bosque y matriz, presentan una composición y estructura que están determinadas principalmente por condiciones ambientales contemporáneas (i.e. variables edáficas) en comparación a eventos históricos (i.e. variables geográficas), los que tendrán relevancia marginal.

### **1.4. Objetivos**

#### **1.4.1. Objetivo general**

Evaluar la importancia relativa de los factores contemporáneos e históricos en la determinación de la composición y estructura de las comunidades bacterianas edáficas presentes en el Parque Nacional Fray Jorge y el Cerro Santa Inés.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

- 1) Caracterizar los parámetros edáficos en los bosques relictos y en las matrices adyacentes presentes en el Parque Nacional Fray Jorge y en el Cerro Santa Inés.
- 2) Determinar la composición bacteriana de las comunidades del suelo del interior de los relictos y del suelo de las matrices no boscosas adyacentes mediante aproximaciones dependientes e independientes de cultivo.
- 3) Caracterizar la estructura, genética y metabólica, de las comunidades bacterianas del suelo del interior de los relictos y del suelo de las matrices no boscosas adyacentes.
- 4) Determinar la influencia de las variables edáficas y del aislamiento geográfico sobre la diversidad de las comunidades del suelo del interior de los relictos y del suelo de las matrices no boscosas adyacentes.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Áreas de estudio y recolección de las muestras de suelo

Durante el mes de agosto del 2013, se recolectaron muestras de suelo de los bosques relictos presentes en el Parque Nacional Fray Jorge y en el cerro Santa Inés, así como también de las matrices en las que éstos se encuentran inmersos (Tabla 1 y Figura 2). Para ello se solicitaron los permisos correspondientes a la Corporación Nacional Forestal (CONAF).

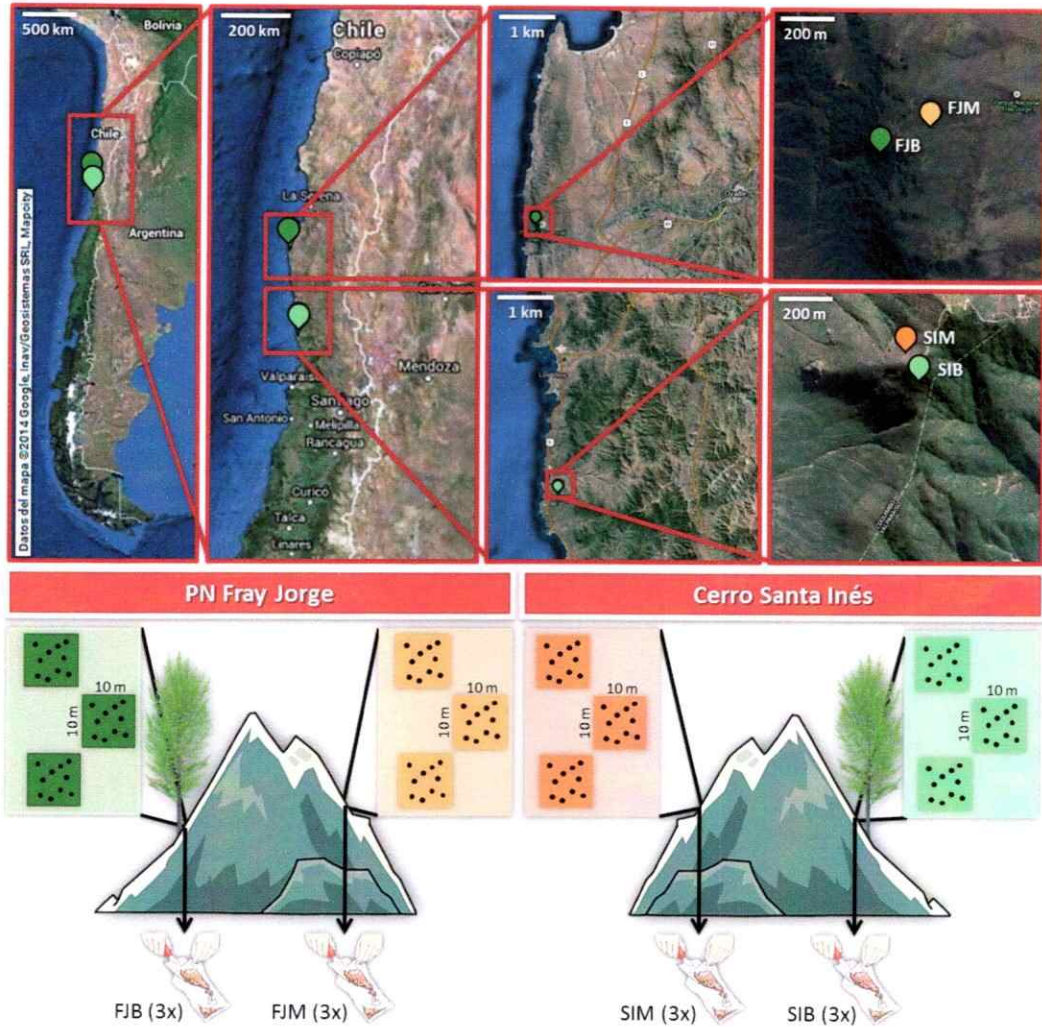
Tabla 1. Coordenadas geográficas y altura en torno a las cuales se llevó a cabo el muestreo.

	Bosque (°Lat;°Lon)	Matriz (°Lat;°Lon)	Altura (msnm)
PN Fray Jorge	-30,6707; -71,6769	-30,6690; -71,6730	561
Cerro Santa Inés	-32,1632; -71,4949	-32,1616; -71,4958	663

En cada uno de los cuatro sitios se definieron 3 parcelas de 10 m x 10 m, separadas por 20-25 m entre sí. En cada parcela se tomaron 10 muestras de suelo (muestras simples) equivalentes y todas provenientes de zonas alejadas de la vegetación. Cada muestra simple consistió en aproximadamente 150 g de la capa superficial del suelo (0-10 cm), las cuales fueron guardadas en hielo y transportadas a Santiago. Una vez en el laboratorio, las muestras se pasaron por un tamiz de 2 mm de tamaño de poro y, para reducir la heterogeneidad espacial, las 10 muestras simples de cada parcela se mezclaron en una muestra compuesta (Fierer y Jackson, 2006;



Guevara, 2007; Lin y col., 2010), obteniendo así 3 muestras compuestas por cada sitio, las que se consideraron réplicas biológicas.



**Figura 2.** Recolección de las muestras de suelo. Localización geográfica de los sitios de muestreo en la Región de Coquimbo (arriba) y esquema de distribución de los puntos de muestreo (abajo). Cada sitio muestreado se representó con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

Posteriormente, las muestras se almacenaron a 4°C para el análisis de los parámetros edáficos, de la fracción de la composición determinada mediante la aproximación dependiente de cultivo y de la estructura metabólica, mientras que una

porción de 10 g se guardó a -80°C para la extracción de DNA. Cada sitio muestreado se representó con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

## 2.2. Determinación de parámetros edáficos

Los parámetros edáficos que se determinaron fueron contenido hídrico (CH), materia orgánica (MO), pH, contenido de Nitrato (Nitrato) y contenido de Amonio (Amonio).

El CH se determinó por gravimetría (Steubing, 2002). Para ello se pesó 1 g de cada réplica de suelo y se determinó el peso húmedo (PH). Luego, éste se secó en estufa a 100°C durante 24 h y se determinó el peso seco (PS). Finalmente, el CH se calculó según la fórmula:  $CH = ((PH - PS) / PS) \times 100$ , y se expresó en gramos de agua por 100 gramos de peso seco de suelo.

La MO se determinó a partir de las muestras secas obtenidas anteriormente, las cuales se calcinaron en una mufla a 400°C durante 16 h, obteniéndose el peso calcinado (PC). El porcentaje de MO se calculó según la fórmula:  $MO = (((PS - PC) / PC) \times 100) \times 0,8$  (Sadzawka y col., 2006).

Para la determinación de pH, Nitrato<sup>-</sup> y Amonio, se resuspendió 1 g de suelo en 10 ml de agua desionizada, se incubó por 1 h a 150 rpm, y se filtró utilizando papel secante. El pH de la suspensión de suelo se midió mediante un peachímetro previamente calibrado. El Amonio se determinó utilizando un electrodo ion selectivo y se asociaron los valores a una curva de calibración previamente analizada con el mismo electrodo. El Nitrato se determinó mezclando en un vial 1 ml de la suspensión inicial con 0,5 ml de solución TRI (1% salicilato de sodio, 0,2% NaCl y 0.1% sulfamato

de amonio en solución de 0,01 M NaOH). Posteriormente la solución se evaporó en estufa a 100°C durante 2 h y se dejó enfriar. Los residuos se resuspendieron con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, luego de 5 min se agregaron 5 ml de agua desionizada y se dejó secar hasta que la solución se enfrió. Finalmente se adicionaron 5 ml de NaOH 40% y se realizó la lectura en espectrofotómetro a 410 nm. Como blanco experimental se utilizó agua desionizada.

### **2.3. Composición de las comunidades edáficas a través de una colección de bacterias cultivables**

#### **2.3.1. Colección de bacterias cultivables**

Se tomaron 20 g de cada muestra compuesta, se colocaron en forma independiente en una licuadora estéril con 180 ml de la solución salina de Winogradsky (WSS [g/L]: 0,25 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,125 MgSO<sub>4</sub>; 0,125 NaCl; 0,0025 Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>; 0,0025 MnSO<sub>4</sub>) y se agitaron por 1 min a máxima velocidad 3 veces con intervalos de enfriamiento en hielo (Wang y Bakken, 1998). Posteriormente, se realizaron diluciones decimales seriadas de las suspensiones en una solución estéril de WSS y se sembraron 200 µl de las diluciones 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-5</sup> en placas con medios de cultivo sólidos. Los medios de cultivo utilizados fueron: R2A (Merck [g/L]: 0,5 extracto de levadura; 0,5 peptona proteasa; 0,5 caseína hidrolizada; 0,5 glucosa; 0,5 almidón soluble; 0,3 piruvato de sodio; 0,3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,024 MgSO<sub>4</sub>; 15 agar-agar) para el crecimiento de bacterias a bajas concentraciones de nutrientes; y LB (Difco [g/L]: 10 triptona; 5 extracto de levadura; 10 NaCl; 15 agar-agar) para el crecimiento de bacterias copiotróficas (Edenborn y Sexstone, 2007). Ambos medios se suplementaron con cicloheximida para inhibir el desarrollo fúngico (100 µg/ml concentración final). Las



placas se incubaron a 25°C durante 24 h - 48 h hasta la aparición de colonias, permitiendo así recuperar bacterias de rápido (LB) y lento (R2A) crecimiento. Los diferentes morfotipos de las colonias recuperadas se aislaron y luego se guardaron en glicerol (15%) a -80°C (Kaiser y col., 2001).

### **2.3.2. Prospección del potencial antagónico de las colonias bacterianas aisladas**

Se evaluaron las propiedades antagónicas de las bacterias aisladas, midiendo su capacidad de competir por hierro (producción de sideróforos), de inhibir el crecimiento de potenciales competidores (producción de HCN), y de digerir la pared celular de hongos e insectos (actividad quitinolítica).

Con el objetivo de medir la producción de sideróforos, las colonias bacterianas aisladas se sembraron en medio agar Cromo AzuroIS (CAS) (Louden y col., 2011), y se incubaron a 28°C hasta la aparición de un halo amarillo o naranja más denso alrededor de las colonias que presentaron esta actividad (7 días) (Fravel, 1988; Nautiyal, 1999; Kannapiran y Ramkumar, 2011; Verma y col., 2012; Kuddus y Ahmad, 2013). Como control positivo se utilizó una solución saturada de 8-hidroquinona (Louden y col., 2011).

Para medir la producción de cianuro, las bacterias se cultivaron sobre agar nutritivo ([g/L]: 5,5 peptona de carne; 3,3 extracto de levadura; 15 agar-agar) suplementado con 4 g/L de glicina. Como indicador, se colocaron en la tapa de cada placa, tiras de papel filtro estéril empapados en ácido pícrico 0,5% y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1%, y se incubaron durante 96 h a 28°C. La presencia de ácido cianhídrico (HCN) se determinó por el cambio de color del papel (Ahmad y col., 2008) y se semi-cuantificó de acuerdo a una escala de color: 1) amarillo, no produce cianuro detectable; 2) naranja claro, producción moderada de cianuro; 3) naranja oscuro, producción alta de cianuro; 4)

café, producción muy alta de cianuro (Donate-Correa y col., 2004). Como control positivo se utilizó una cepa de *Pseudomonas fluorescens* aislada y evaluada previamente en el laboratorio.

En el caso de la detección de actividad quitinolítica, se cultivaron las bacterias aisladas en medio agar quitina coloidal ([g/L]: 0,7 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,3 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,1 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,1 ZnSO<sub>4</sub>; 0,1 MnCl<sub>2</sub>; 0,04 extracto de levadura; 10 quitina coloidal; 20 agar-agar) (Murthy y Bleakley, 2012). Las placas se incubaron a 37°C por 1 semana y las colonias que mostraron zonas de hidrólisis en un fondo blanquecino fueron consideradas como bacterias productoras de quitinasas (Kudus y Ahmad, 2013). Como control positivo y para la estandarización del medio se inocularon diferentes concentraciones de quitinasa comercial de *Serratia marcescens* (Sigma-Aldrich).

### 2.3.3. Amplificación del gen del rRNA 16S de las colonias bacterianas aisladas

Se seleccionaron aquellos aislados que mostraron al menos una de las actividades antagónicas medidas en la sección 2.3.2. En dicha selección se consideró que los aislados produjeran ácido cianhídrico en un rango igual o mayor a la coloración naranja ( $\geq 2$ ), y halos sobre 2 mm para la producción de sideróforos o quitinasa.

Tras ello y con el fin de identificar molecularmente las colonias bacterianas aisladas, se cultivaron en los medios de cultivo LB o R2A líquidos, según en cual de ellos fueron obtenidas, y se incubaron durante 24 h en agitación a 28°C. Tras ello, cada cultivo bacteriano se sometió a shock térmico (90°/0°C), y se utilizó como molde para la amplificación por PCR del marcador molecular rRNA 16S, el cual codifica para la subunidad menor del ribosoma en bacterias. Para ello se utilizaron los partidores universales fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rP2 (5'-

ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg y col., 1991). La mezcla de reacción se preparó en un volumen de 25 µl con "GoTaq® Green Master Mix" (Promega; 1X DNA polimerasa, 200 µM dNTP y 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> [pH 8,5]), 400 nM de cada partidor y 10-20 ng de DNA genómico como molde. El programa de amplificación consistió en una etapa inicial de 3 min a 94°C seguida de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 57°C y 2 min a 72°C, adicionando una extensión final durante 20 min a 72°C.

En todos los casos se prepararon controles negativos utilizando reacciones idénticas pero sin DNA molde para verificar la ausencia de DNA foráneo contaminante. Asimismo, se usaron como control positivo DNA genómicos de cepas bacterianas conocidas. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA [pH 8.0]) y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. Para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados, se usó el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen).

Los productos de PCR se secuenciaron en un sentido (Macrogen Inc.) usando un analizador genético 3730XL (Applied Biosystems) y el partidor fD1. Las secuencias obtenidas se editaron con el software MEGA 5 y se guardaron en formato FASTA para los análisis posteriores.

## **2.4. Composición de las comunidades edáficas a través de la construcción de genotecas**

### **2.4.1. Obtención de DNA desde las muestras de suelo y amplificación del gen del rRNA 16S**

A partir de 0,25 g de cada muestra supracompuesta para cada localidad (mezcla homogénea de las 3 muestras compuestas o réplicas de cada sector), se realizó la extracción de DNA usando el kit "PowerSoil DNA Isolation" (MoBioLaboratories Inc.) según indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones para optimizar el rendimiento. Específicamente, la mezcla con la solución C2 se incubó a 4°C toda la noche, la solución C3 se incubó por 60 min a 4°C, y finalmente, para eluir el DNA, se agregaron 60 µl de la solución C6, conservándose el DNA a -20°C. La concentración de DNA se evaluó espectrofotométricamente (Nanodrop). La integridad del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa como se mencionó anteriormente pero a una concentración del 0,8% (p/v) y utilizando el marcador de peso molecular 1 kb (Promega).

La amplificación del marcador molecular rRNA 16S se realizó utilizando como molde 10-20 ng de DNA genómico y las condiciones descritas en la sección 2.3.3.

### **2.4.2. Clonación y secuenciación**

Mediante la utilización del kit "Wizard SV PCR Clean-Up System" (Promega) se purificaron 0,3 µg de los productos de PCR obtenidos con los partidores fD1 y rP2. El proceso de ligado se realizó mediante el kit "InsTAclone™ PCR Cloning" (Fermentas) ligando el producto de PCR al vector pTZ57R/T y la transformación se realizó mediante el kit "TransformAid" utilizando la cepa *Escherichia coli* 3M107 según las instrucciones

del fabricante. Los transformantes se crecieron en medio LB y se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (50 µg/ml) y por su incapacidad de hidrolizar el compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido) en presencia de IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido). La presencia del inserto esperado se corroboró mediante PCR usando los partidores M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). La mezcla de reacción se preparó de la misma forma en que se indicó en la sección 2.3.3. El programa de amplificación consistió en una etapa inicial de 3 min a 94°C seguida de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 56°C y 1,5 min a 72°C, adicionando una extensión final durante 10 min a 72°C. El tamaño de los amplicones se corroboró en geles de agarosa al 1,2% (p/v), utilizando el patrón estándar 1 kb (Promega).

Tras ello se seleccionaron 98-100 clones de cada una de las cuatro genotecas. Los clones seleccionados que poseían el inserto del tamaño esperado se cultivaron independientemente en medio LB líquido por una noche y se guardaron en glicerol al 15% (v/v) a -80°C. Para recuperar el DNA de las colonias, se tomaron 0,4 µl de cada stock, y se usaron como molde en una reacción de PCR usando los partidores M13F y M13R. Los productos de PCR se secuenciaron en un sentido con el partidior fD1 usando un analizador genético 3730XL (Applied Biosystems; Macrogen Inc.). Las secuencias obtenidas se editaron con el software MEGA 5 y se guardaron en formato FASTA.

## **2.5. Análisis de los datos de composición**

### **2.5.1. Análisis de las secuencias del marcador rRNA 16S**

La evaluación de la presencia de quimeras se realizó en el programa MOTHUR (Schloss y col., 2009) con el comando UCHIME (Edgar y col., 2011) y la base de datos SILVA (<http://www.arb-silva.de>).

Las secuencias parciales del marcador molecular rRNA 16S, obtenidas en las 4 genotecas y en la selección de colonias bacterianas aisladas, se alinearon con el programa de alineamiento SINA ([www.arb-silva.de/aligner/](http://www.arb-silva.de/aligner/)) implementado en el programa ARB (Ludwig y col., 2004) utilizando como referencia las bases de datos SILVA y LTP (<http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>). Luego de seleccionar las secuencias de las bases de datos cercanas a las secuencias de clones y colonias, se construyeron dos árboles, uno de ellos mediante el algoritmo de Neighbor Joining, con corrección Jukes Cantor, y el otro mediante RAXML, con el modelo GTRGAMMA. Tras ello, se agregaron en cada árbol, por Máxima Parsimonia, las secuencias parciales provenientes de los clones y las colonias de los sitios muestreados. Finalmente, se asociaron las secuencias de cada uno de los clones o colonias de las ramas terminales con la secuencia tipo de la base de datos que estuviera más cercana, esto para formar las unidades filogenéticas operacionales (OPUs).

### **2.5.2. Estimación de la cobertura alcanzada mediante las aproximaciones dependientes e independientes de cultivo**

La abundancia de cada OPU en cada una de las comunidades muestreadas se analizó con el programa Analytic rarefaction 1.3 (Holland, 2003) y con los datos obtenidos se construyó una curva de rarefacción que se ajustó a una curva teórica

mediante una regresión no lineal (GraphPad Prism 4.0). Se estimó la cobertura aplicando la fórmula  $C=1-(N_x/n)$ , donde  $N_x$  representa el número de grupos diferentes y  $n$  el número total de secuencias analizadas (Good, 1953).

## **2.6. Estructura genética de las comunidades a través del polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción terminales (TRFLP)**

### **2.6.1. Obtención de DNA desde las muestras de suelo y amplificación del gen del rRNA 16S**

Desde cada muestra de suelo compuesta se obtuvo DNA siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección 2.4.1, pero utilizando muestras compuestas individuales. Tras confirmar que el DNA obtenido poseía una buena calidad, se procedió a la amplificación para el ensayo de TRFLP. En este caso se usaron las mismas condiciones de reacción mencionadas en la sección 2.3.3., pero con el partidor directo (fD1) marcado con 6-FAM (6-carboxifluoresceína) en el extremo 5'. Los productos de PCR de los genes del rRNA 16S marcados con 6-FAM, se purificaron mediante el kit "Wizard SV PCR Clean-Up System" (Promega) y se cuantificaron espectrofotométricamente.

### **2.6.2. Restricción de los productos de PCR**

Entre 80-100 ng de los productos de PCR se digirieron con 30 U de dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *AluI*; Fermentas) a 37°C por 16 h en reacciones independientes. Tras ello se inactivaron las enzimas incubando a 65°C por 20 min. Posteriormente se llevó a cabo una precipitación alcohólica agregando 0,1 volúmenes de acetato de sodio (3 M) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, y se incubó a -20°C por 12 h.

Posteriormente, se centrifugó a 4°C durante 30 min a 13000 rpm y el pellet se lavó con etanol 70% centrifugando a 4°C por 10 min a 13000 rpm. Finalmente, se secó el pellet a temperatura ambiente y se resuspendió el DNA en 20 µl de solución TE (10 mM Tris y 1 mM EDTA [pH 8,0]). Los fragmentos digeridos se separaron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems; Macrogen Inc.). El tamaño de los fragmentos y las unidades de fluorescencia se determinaron usando el programa GeneScan 3.1 (Applied Biosystems).

### 2.6.3. Análisis de los perfiles de TRFLP

Para cada muestra se generó un electroferograma y se compararon los TRFs mediante análisis *in silico*. Los patrones de las diferentes muestras se normalizaron a idénticas unidades de fluorescencia total, mediante un procedimiento de normalización iterativo (Dunbar y col., 2001) y se calculó la abundancia relativa de los TRF en cada muestra. Para ello se sumaron las alturas de todos los picos en cada perfil. El valor obtenido (unidades de fluorescencia, UF), representó la abundancia total de cada TRF en las diferentes muestras y con este valor se determinó la abundancia relativa (%) de cada TRF respecto al total (Yeager y col., 2004). Aquellos picos con abundancia relativa menor a 2%, se consideraron por debajo de la línea basal, no distinguibles de cero y no se tuvieron en cuenta en el análisis. Las comunidades se caracterizaron por el número (riqueza) y la altura de los picos (abundancia) de cada electroferograma. La estimación de la diversidad de la comunidad microbiana se realizó mediante el índice de diversidad de Shannon, según la fórmula  $H = -\sum p_i \ln p_i$  (Begon y col. 1990), donde  $p_i$  es la proporción de cada fragmento terminal dentro del total de TRFs de cada perfil. Así también, se determinó el índice de equidad (J) usando la fórmula  $J = H /$



$H_{\text{máx}}$  (Begon y col., 1990), donde  $H_{\text{máx}} = \ln S$ , considerando a  $S$  como el número de TRFs dentro de cada muestra (riqueza).

## **2.7. Estructura metabólica de las comunidades a través de los perfiles metabólicos a nivel comunitario (CLPP)**

### **2.7.1. Obtención del inóculo microbiano y medición de la utilización de diferentes fuentes de carbono**

Para determinar la diversidad metabólica de las comunidades bacterianas se utilizaron placas EcoPlate™ (BIOLOG®). Estas placas de 96 pocillos contienen 31 fuentes de carbono en triplicado (Figura 3) y permiten detectar la utilización de cada una de ellas (Garland y Mills, 1991). Los inóculos para las placas se prepararon a partir de 1 g de muestra de suelo compuesta resuspendida en solución estéril PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). La mezcla se agitó durante 1 h a 150 rpm, posteriormente se filtró la suspensión y se inocularon 100 µL de los filtrados en cada pocillo. Las placas inoculadas se incubaron en una cámara húmeda a 25°C por una semana y cada 24 h se registró el desarrollo de color en los pocillos individuales midiendo la absorbancia a 590 nm con un lector de placas automatizado Epoch (Biotek).

Dado que el consumo de las fuentes de carbono en la placa resulta en el uso de enzimas de la respiración, al consumir las bacterias dichas fuentes de carbono, redujeron las sales de Tetrazolium (inoloro) al colorante púrpura Formazán.

A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

**Figura 3.** Distribución de las 31 fuentes de carbono dispuestas en triplicado en las placas **Ecoplate™ (BIOLOG®)** (Disponible en: [http://www.biolog.com/pdf/milit/00A\\_012\\_EcoPlate\\_Sell\\_Sheet.pdf](http://www.biolog.com/pdf/milit/00A_012_EcoPlate_Sell_Sheet.pdf)).

### 2.7.2. Análisis de los perfiles de CLPP

Para el análisis de los datos de absorbancia, se restaron a las lecturas de absorbancia obtenidas en los diferentes tiempos de incubación de la placa, la lectura al tiempo cero correspondiente (Insam y Goberna, 2004) y la del pocillo control (sin fuente de carbono). El desarrollo promedio de color en el tiempo, como respuesta microbiana en las placas (Garland, 1997), se ajustó a la ecuación de Gompertz modificada (Zwietering y col., 1990) con el programa OriginPro8, y posteriormente se calcularon los parámetros cinéticos de los perfiles metabólicos ( $\lambda$ : tiempo de latencia,  $\mu$ : tasa máxima de desarrollo de color, y A: absorbancia máxima). Mediante estos cálculos se determinó el tiempo de incubación de las placas en que las comunidades se

encuentran en fase exponencial, datos que se utilizaron para llevar a cabo el análisis comparativo de los perfiles metabólicos a nivel comunitario de las diferentes muestras. La estimación de diversidad de las muestras se realizó como se mencionó en la sección 2.6.3.

## **2.8. Análisis estadísticos**

Para determinar si existen diferencias significativas entre los bosques y las matrices de ambas localidades en cuanto a los datos de los parámetros edáficos pH, Nitrato y Amonio obtenidos por triplicado para cada réplica biológica (N = 9 por sitio), primero se confirmó la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, tras lo cual se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un post test de Bonferroni en el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc).

En el caso de los demás parámetros edáficos (MO y CH), del recuento de colonias aisladas, de los índices de diversidad (H, J y S), y de los parámetros cinéticos ( $\lambda$ ,  $\mu_m$  y A), obtenidos para cada réplica biológica (N = 3 por sitio), no se pudo evaluar la normalidad en la distribución de los datos; por ello la existencia de diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la no superposición de los intervalos de confianza de las mediciones en cada sitio luego de 10.000 re-muestreos al azar llevados a cabo con el programa R versión 2.2-1 (R Core team, 2015) y el paquete *boot* (Canty y Ripley, 2015).

## **2.9. Análisis multivariados**

Para evaluar la influencia de los parámetros geográficos (espaciales) y edáficos (ambientales) sobre la composición (colonias + clones), la estructura (TRFLP + CLPP)

y la diversidad (composición + estructura), se realizó un análisis multivariado de redundancia (RDA) (ter Braak, 1994; Legendre y Legendre, 1998; Leps y Smilauer, 2003). Las variables explicativas utilizadas fueron los parámetros edáficos (pH, MO, CH, Nitrato y Amonio) y las coordenadas geográficas que se transformaron a coordenadas UTM (x: latitud; y: longitud) (<http://www.latlong.net/lat-long-utm.html>) para calcular variables de segundo orden ( $x + y + x^2 + xy + y^2$ ) con el fin de modelar patrones espaciales simples no lineales (Legendre y Legendre, 1998).

Inicialmente, sobre cada grupo de datos independientemente, se llevó a cabo un análisis de correspondencia de residuales o destendenciado (DCA) para determinar si la distribución de los datos seguía un modelo unimodal o lineal. En los casos en que los datos se ajustaron al modelo unimodal, se aplicó la transformación de Hellinger (Borcard y col., 2011).

Tras ello se determinó si el análisis inicial RDA era significativo y se procedió a aplicar el criterio de *forward selection* (Peres-Neto y col., 2006) utilizando el paquete *packfor* (Dray y col., 2015) en el programa R versión 2.2-1, para seleccionar un subconjunto de variables edáficas y geográficas que explicaran parsimoniosamente la varianza de la comunidad (Hovatter y col., 2011). Las significancias del análisis, de los ejes y de las variables explicativas se analizaron por medio de 999 permutaciones bajo un modelo directo. Finalmente, mediante partición de varianza, se cuantificó la proporción de la variación de los datos que se explica por un componente puramente espacial (Geografico), por uno puramente ambiental (edáfico) y por otro componente de superposición espacial-ambiental, donde ambos efectos no pueden ser separados.

Todos los análisis multivariados y transformaciones mencionadas anteriormente, salvo que se especificara lo contrario, se llevaron a cabo utilizando el paquete *vegan* (Oksanen y col. 2015) en el programa R versión 2.2-1.

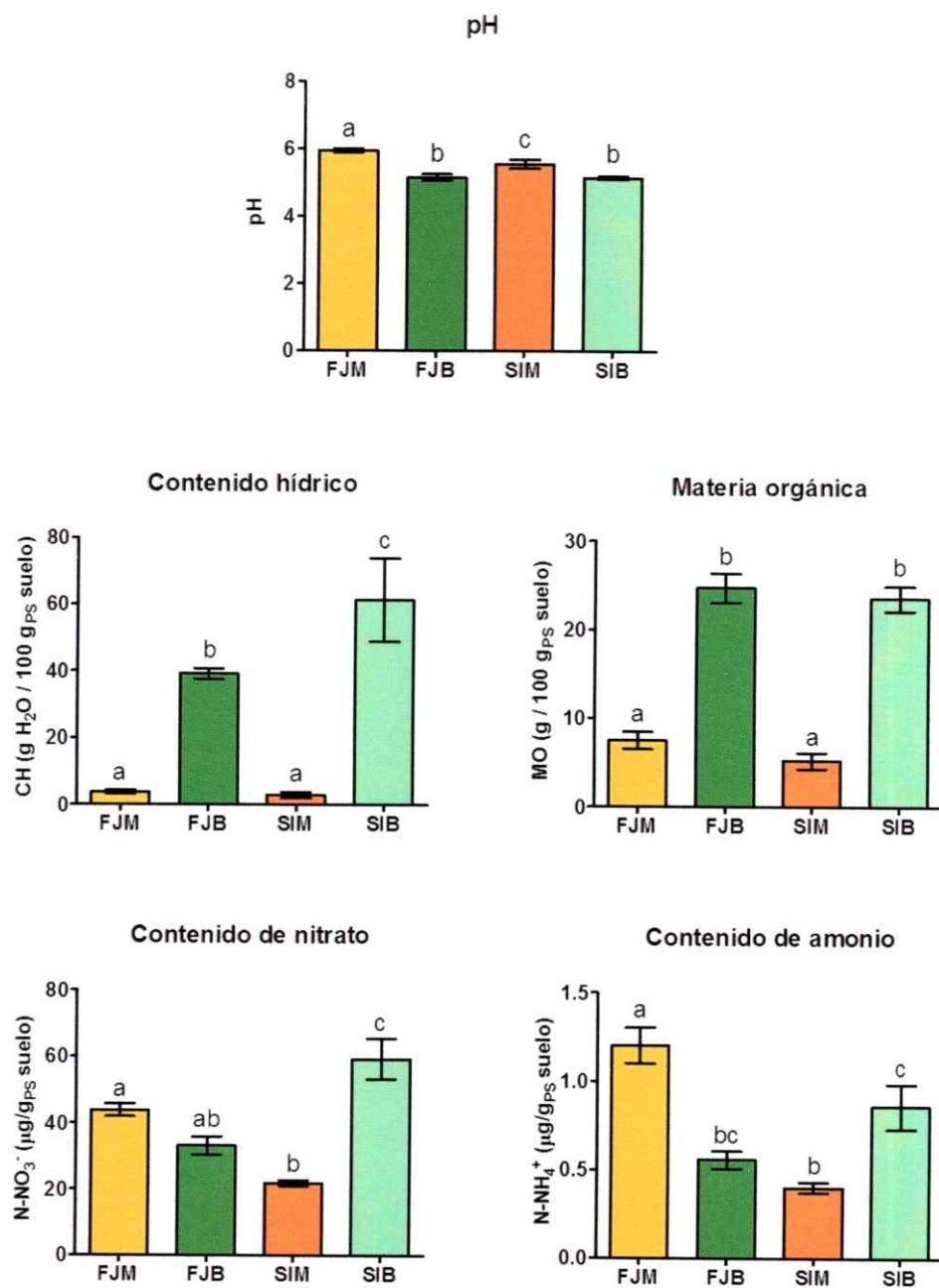
## 3. Resultados

### 3.1. Análisis de parámetros edáficos

Al comparar la matriz (FJM) y el bosque (FJB) del parque Nacional Fray Jorge se observó que existen diferencias significativas en la materia orgánica, el pH, el contenido hídrico y el de amonio, mientras que no se observaron diferencias al medir el contenido de nitrato. En el Cerro Santa Inés, las muestras de matriz (SIM) y las de bosque (SIB) difieren significativamente en todos los parámetros del suelo analizados (Figura 4).

El suelo del bosque del cerro Santa Inés (SIB) presentó significativamente mayor contenido hídrico y de nitrato que los bosques del Parque Nacional Fray Jorge (FJB), no observándose diferencias en los demás parámetros. Por otro lado, la matriz del Parque Nacional Fray Jorge (FJM) presentó valores significativamente mayores en el contenido de nitrato, amonio y pH que la matriz del Cerro Santa Inés (SIM).

Al comparar las matrices con los bosques, se observan valores significativamente menores de materia orgánica y contenido hídrico en las primeras; mientras que los valores de pH más ácidos se presentaron en los bosques. Al analizar el contenido de nitrato y amonio, se observa un comportamiento variable entre los bosques y las matrices de cada sitio.



**Figura 4.** Parámetros edáficos medidos en las muestras de suelo. Las barras de error corresponden al error estándar. Letras diferentes representan valores significativamente diferentes según el postest de Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ) o de acuerdo a la no superposición de los intervalos de confianza luego de 10.000 re-muestréos al azar. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

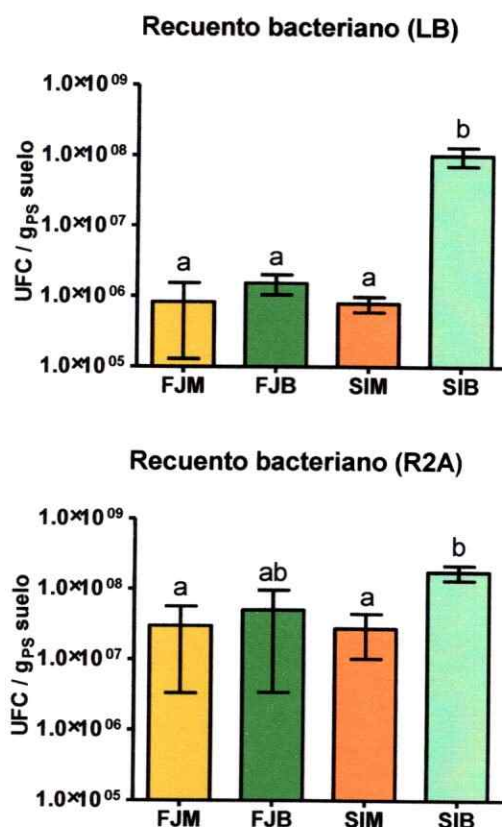
### **3.2. Composición de las comunidades bacterianas edáficas**

La composición de las comunidades bacterianas predominantes en cada suelo, se determinó mediante la utilización de una aproximación molecular dependiente y otra independiente de cultivo, con el objeto de recuperar una fracción mayor de la diversidad.

#### **3.2.1. Construcción de una colección de bacterias cultivables y selección de aislados con propiedades antagónicas**

##### ***3.2.1.a. Determinación del título bacteriano de los suelos***

El título de la fracción cultivable de bacterias de las muestras de suelo se obtuvo en dos medios de cultivo, uno de ellos con alto contenido de nutrientes, medio LB, y otro con bajo contenido de nutrientes, medio R2A (Figura 5). En el suelo del bosque del Cerro Santa Inés (SIB) fue posible rescatar, en ambos medios de cultivo, un título bacteriano significativamente mayor comparado con las demás muestras analizadas, rondando  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por gramo de peso seco de suelo (UFC / g<sub>PS</sub> suelo); mientras que los otros sitios (SIM, FJM y FJB) no presentaron diferencias significativas entre sí en ninguno de los dos medios, alcanzando una carga bacteriana dos órdenes de magnitud menor que SIB ( $1 \times 10^6$  UFC/g<sub>PS</sub> suelo) para el medio de cultivo LB y un orden de magnitud menor ( $1 \times 10^7$  UFC/g<sub>PS</sub> suelo) en el caso del medio de cultivo R2A.



**Figura 5.** Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas obtenidas en los medios de cultivo LB (copiotrófico, arriba) y R2A (oligotrófico, abajo). Las barras de error corresponden al error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la no superposición de los intervalos de confianza luego de 10.000 re-muestréos al azar. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

### 3.2.1.b. *Prospección de propiedades antagónicas en la colección de bacterias aisladas*

En total se aislaron 265 morfotipos bacterianos desde las 4 muestras de suelo (FJM: 62, FJB: 62, SIM: 39 y SIB: 102), considerando como caracteres distintivos entre ellos: el tiempo de aparición de la colonia, el tamaño, el color, la textura, los bordes, la





elevación y la opacidad. A modo de ejemplo se muestra una selección de las colonias bacterianas aisladas en la Figura 6.



**Figura 6.** Muestrario del tipo de colonias de las bacterias aisladas en los medios LB (copiotrófico) y R2A (oligotrófico).

Tras obtener colonias bacterianas aisladas, se procedió a seleccionar las bacterias cultivables según sus propiedades antagónicas. Para ello, se inoculó cada una de las colonias bacterianas en medios selectivos específicos con el objetivo de evaluar la producción de cianuro, sideróforos y quitinasas.

Se determinó que aproximadamente un 20% de las bacterias aisladas eran productoras de sideróforos al considerar como positivas a aquellas colonias cuyo halo fue superior a 2 mm y utilizando como control positivo una solución saturada de 8-hidroxiquinona (Figura 7A). Las bacterias aisladas presentaron diferentes grados de producción de sideróforos, reflejados en el tamaño del halo que se generó en torno a cada colonia (Figura 7B). En cuanto a los sitios de muestreo, se observó que los bosques presentaron un mayor porcentaje de bacterias productoras de sideróforos (SIB: 9,0% en LB y 16,0% en R2A; FJB: 11,2% en LB y 12,8% en R2A) en relación a

las matrices (SIM: 5,0% en LB y 5,0% en R2A; FJM: 7,8% en LB y 6,2% en R2A) (Figura 7C).

Asimismo, se observó que en promedio un 21,8% del total de los aislados bacterianos presentó algún grado de producción de ácido cianhídrico (HCN) según la tabla colorimétrica de cuantificación (Figura 7D). En el Parque Nacional Fray Jorge, un 32,0% de las bacterias aisladas desde suelo boscoso presentaron algún grado de producción de este compuesto, de éstas un 20,8% provenían del medio R2A y un 11,2% del medio LB; mientras que en la matriz solo lo produjeron un 5% de los aislados bacterianos, todos recuperados en el medio R2A. Por el contrario, en el Cerro Santa Inés, un 43,0% de las bacterias aisladas desde suelo presente en la matriz mostró algún grado de producción de HCN y de éstas el 27,9% provenían del medio R2A y un 15,1% del medio LB; mientras que en la zona boscosa solo un 18,0% de las bacterias aisladas produjo HCN, de las cuales un 10,6% provenían del medio R2A y un 7,4% del medio LB (Figura 7E). En resumen, se observa que los mayores porcentajes de bacterias productoras de HCN se recuperaron del medio de cultivo R2A, y que bajo las condiciones establecidas en este ensayo no existe una relación entre el tipo de suelo o el sitio de procedencia de las muestras y la presencia de bacterias con potencial producción de dicho compuesto.

Finalmente, solo un 2,2% del total de bacterias aisladas presentaron un halo en torno a la colonia, como el que se muestra en la Figura 7G, y produjeron enzimas capaces de hidrolizar el polímero de quitina. Como control del ensayo se utilizaron diferentes concentraciones de una enzima quitinasa comercial de *Serratia marcescens* (Figura 7F). Así, al comparar entre los sitios muestreados, se observó que en la matriz del Parque Nacional Fray Jorge (FJM) un 6,0% de las bacterias fueron productoras de quitinasas (3,0% en medio LB y 3,0% en medio R2A), mientras que las bacterias

aisladas del bosque (FJB) no fueron capaces de generar actividad quitinasa detectable. Por otro lado, en el Cerró Santa Inés, se detectó en el bosque (SIB) que solo un 1,0% de las bacterias aisladas eran productoras de quitinasas (todas recuperadas en el medio LB), versus un 3% de las bacterias provenientes de la matriz (SIM) (todas recuperadas en el medio R2A) (Figura 7H).

**Figura 7 (página siguiente).** Medición de propiedades antagónicas de las colonias de bacterias aisladas. *Producción de Sideróforos.* A) Ensayo con solución saturada de 8-hidroxiquinona (control positivo); B) Ejemplos de bacterias productoras de sideróforos; C) Diagramas circulares del porcentaje de bacterias productoras de sideróforos (positivos: bacterias capaces de generar un halo mayor a 2 mm en medio CAS/HDTMA). *Producción de Cianuro.* D) Escala colorimétrica cualitativa de producción bacteriana de cianuro (1: amarillo, no hay producción; 2: naranja claro: producción moderada; 3: naranja oscuro, producción alta; 4: café, producción muy alta; E) Diagramas circulares del porcentaje de bacterias productoras de cianuro, en medio nutritivo, cuantificado según estándar de coloración. *Producción de Quitinasas.* F) Curva de calibración con quitinasa comercial de *Serratia marcescens* (concentraciones: 2,5 U/ml; 1,25 U/ml; 0,625 U/ml; 0,3125 U/ml; 0,156 U/ml); G) Ejemplos de bacterias productoras de quitinasas; H) Diagrama circular del porcentaje de bacterias productoras de quitinasas capaces de generar un halo en medio de quitina coloidal al 1% (p/v). Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz (N=63); FJB, Fray Jorge Bosque (N=63); SIM, Santa Inés Matriz (N=39); SIB, Santa Inés Bosque (N=100).

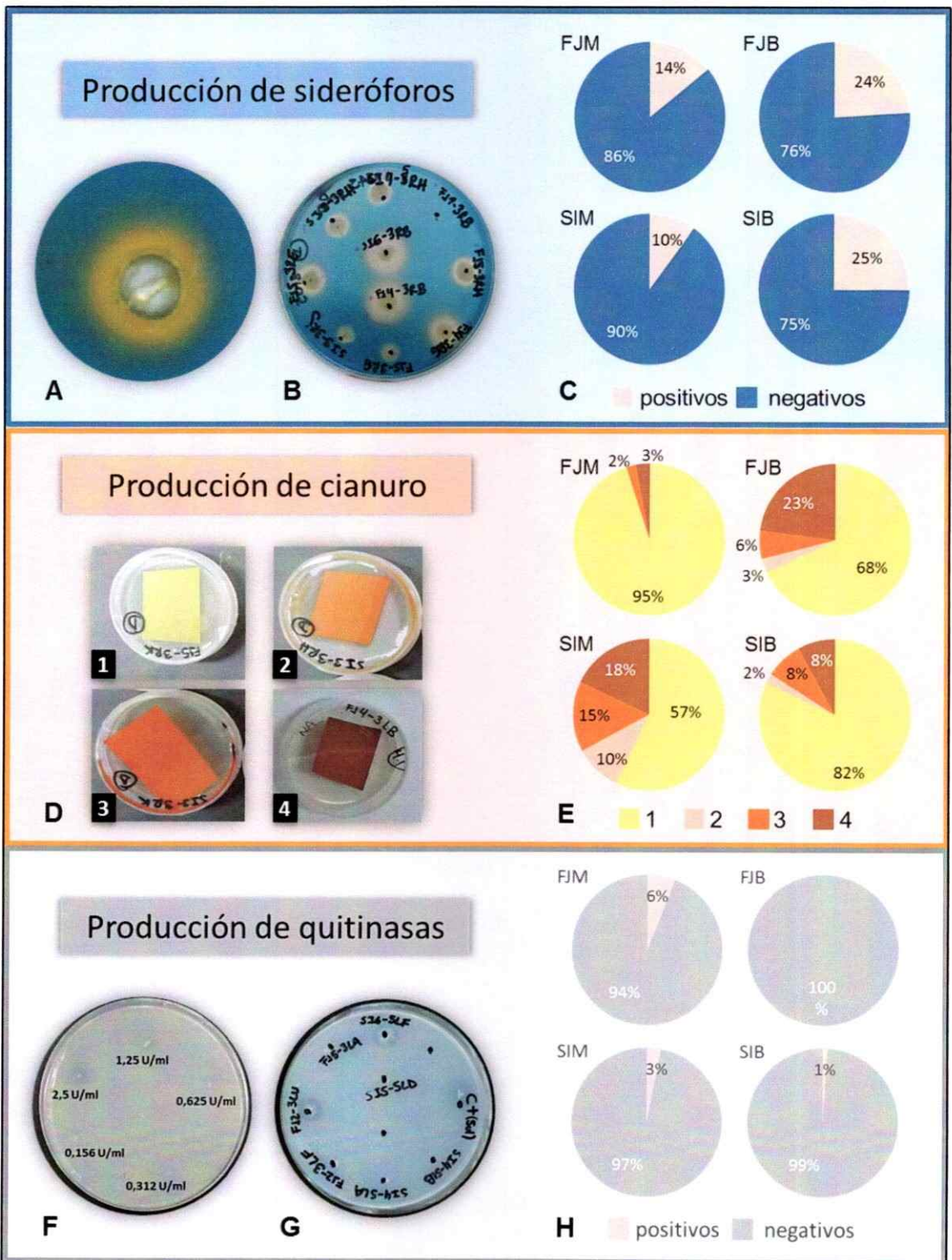


Figura 7. (Leyenda en página anterior).

### **3.2.2. Composición de las comunidades edáficas determinada mediante la colección de bacterias cultivables y la construcción de librerías génicas**

#### **3.2.2.a. Análisis de secuencias**

Con el objetivo de proceder a la identificación de las secuencias obtenidas por cada aproximación, dependiente (colonias) e independiente (clones) de cultivo, primero se seleccionaron, desde la colección de bacterias cultivables, aquellas bacterias que poseían respuesta positiva en al menos 1 de las 3 actividades antagónicas analizadas anteriormente (Sección 3.2.1.b.). De las 265 bacterias aisladas inicialmente, se seleccionaron 75 bacterias (16 de FJM, 12 de FJB, 17 de SIM y 30 de SIB), las que se cultivaron en medio líquido y desde las cuales se amplificó y secuenció el marcador rRNA 16S. Asimismo, se secuenció el marcador rRNA 16S desde los clones de las librerías génicas, obteniéndose 354 secuencias adicionales (90 de FJM, 89 de FJB, 88 de SIM y 82 de SIB).

El total de las secuencias obtenidas por ambas aproximaciones, (429; Tabla A1 Anexos) se analizaron con el programa ARB, generándose árboles con las secuencias cercanas de las bases de datos definidos a través de los análisis de Neighbor Joining y RAxML, y a los cuales se agregaron las secuencias en análisis por Máxima Parsimonia. Ambos árboles se compararon observándose diferencias en las ramas terminales en solo 7 de 70 familias. Por lo tanto, se decidió continuar con el árbol construido mediante el análisis de Neighbor Joining para facilitar la definición de OPUs y la determinación de la identidad de las mismas.

### 3.2.2.b. Estimación de la cobertura

Con el objetivo de estimar la cobertura del muestreo, se construyeron curvas de rarefacción considerando la abundancia de OPUs de las librerías génicas (clones) y de los aislados bacterianos (colonias).

Los resultados del ajuste de las curvas se muestran en la Tabla 2. Analizando el método independiente de cultivo se observa que los porcentajes de cobertura son en promedio cercanos al 30%, excepto para FJM en el que alcanza sólo un 16,7%. Por otro lado, con el método dependiente de cultivo, los porcentajes de cobertura son considerablemente mayores, superando una cobertura del 60%, pero una vez más, el sitio para el que se logró una menor cobertura fue FJM (25%).

La tendencia observada es similar en los cuatro sitios (FJM, FJB, SIM y SIB), no siendo suficiente el muestreo para cubrir la diversidad de bacterias esperadas en todos los casos. No obstante, las secuencias rescatadas en los sitios muestreados representarían los grupos bacterianos más abundantes en estos tipos de suelos.

**Tabla 2.** Parámetros del ajuste de las curvas de rarefacción y cálculo de la cobertura alcanzados a partir de las colonias de bacterias aisladas y los clones de las genotecas. OPU: unidad filogenética operacional. Cx= Cobertura expresada en porcentaje. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

	Sitio de muestreo	Clones/Colonias analizados	OPUs observadas	Nº teórico máximo de OPUs	R <sup>2</sup>	Cx (%)
Clones	FJM	90	75	455	1,0000	16,7
	FJB	89	65	235	1,0000	27,0
	SIM	88	62	224	0,9999	30,0
	SIB	82	58	187	0,9999	29,3
Colonias	FJM	12	9	31,5	0,9998	25,0
	FJB	16	6	9,5	0,9978	62,5
	SIM	17	6	12,9	0,9793	64,7
	SIB	30	10	16,2	0,9882	66,7

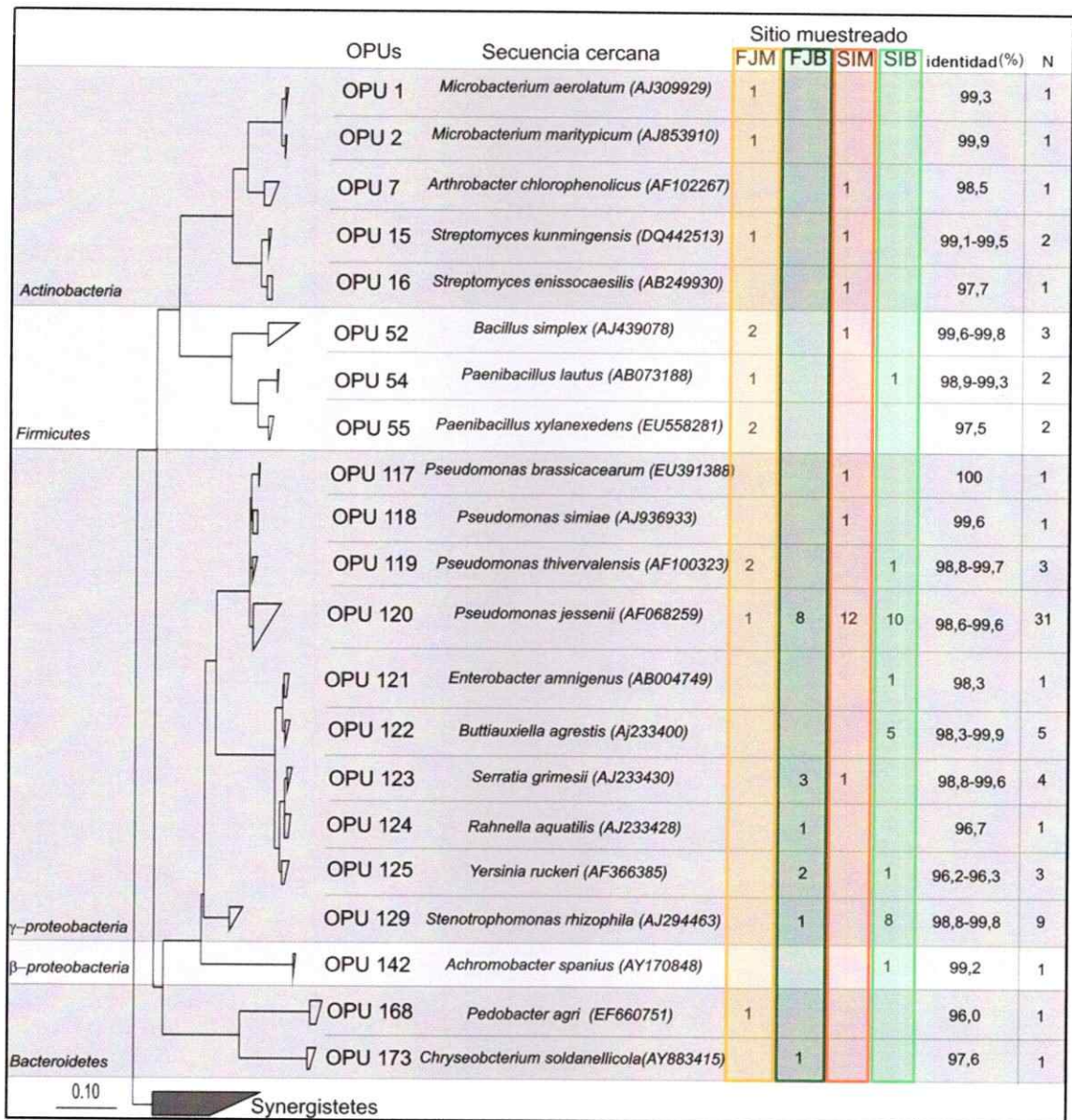
### **3.2.2.c. Identificación de las unidades filogenéticas operacionales (OPUs) y comparación de la composición obtenida por ambas aproximaciones**

Las 75 secuencias obtenidas desde las colonias de los aislados bacterianos se clasificaron en 21 OPUs (Figura 8), distribuidas en 4 filos bacterianos, *Actinobacteria* (6 secuencias), *Firmicutes* (7 secuencias), *Bacteroidetes* (2 secuencias) y *Proteobacteria*, dividido en dos clases, *Beta-proteobacteria* (1 secuencia) y *Gamma-proteobacteria* (59 secuencias). Se observa que las bacterias aisladas que presentaron algún grado de actividad se concentraron en el filo *Proteobacteria* clase *Gamma-proteobacteria*, asociándose un 48% de las bacterias seleccionadas (36 secuencias) al género *Pseudomonas* con un alto grado de identidad (sobre el 98,6%). Particularmente, 31 bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria* se asociaron con un alto porcentaje de identidad (98,6-99,6%) a una OPU cuya secuencia cercana fue *Pseudomonas jessenii* (1 aislada de FJB, 8 de FJM, 12 de SIB y 10 de SIM). Otros géneros representados en dicho filo fueron *Enterobacter*, *Buttiauxiella*, *Serratia*, *Rahnella*, *Yersinia* y *Stenotrophomonas*, todos presentes solo en las muestras de suelo de bosque, con excepción de una secuencia relacionada a *Serratia* proveniente de la matriz del Cerro Santa Inés (SIM). En la clase *Beta-proteobacteria*, la secuencia de la bacteria aislada desde el bosque del Cerro Santa Inés (SIB) se relacionó con una secuencia del género *Achromobacter*, con un porcentaje de identidad sobre el 99%.

En el filo *Actinobacteria*, se distribuyeron 6 secuencias en 3 géneros, *Microbacterium*, *Arthrobacter* y *Streptomyces*, todas provenientes de bacterias aisladas desde los suelos de las matrices. El género *Microbacterium* se asoció sólo a las muestras de suelo de FJM, mientras que *Arthrobacter* sólo se asoció a SIM. Por su parte, *Streptomyces* se observó en ambas matrices (FJM y SIM).

En el filo *Firmicutes*, se distribuyeron 7 secuencias en 2 géneros, *Bacillus* y *Paenibacillus*, 5 secuencias pertenecen al sitio FJM y solo 1 secuencia por género se asoció a SIB y SIM. Finalmente, en el filo *Bacteroidetes*, se encontraron 2 secuencias que provienen de aislados bacterianos del Parque Nacional Fray Jorge, las que se asociaron a los géneros *Pedobacter* y *Chryseobacterium*. Si se considera el porcentaje de similitud más estricto para el nivel de especie descrito hasta la fecha, 98,7% (Yarza y cols, 2014), es posible predecir que 9 de los aislados bacterianos podrían considerarse putativas nuevas especies.

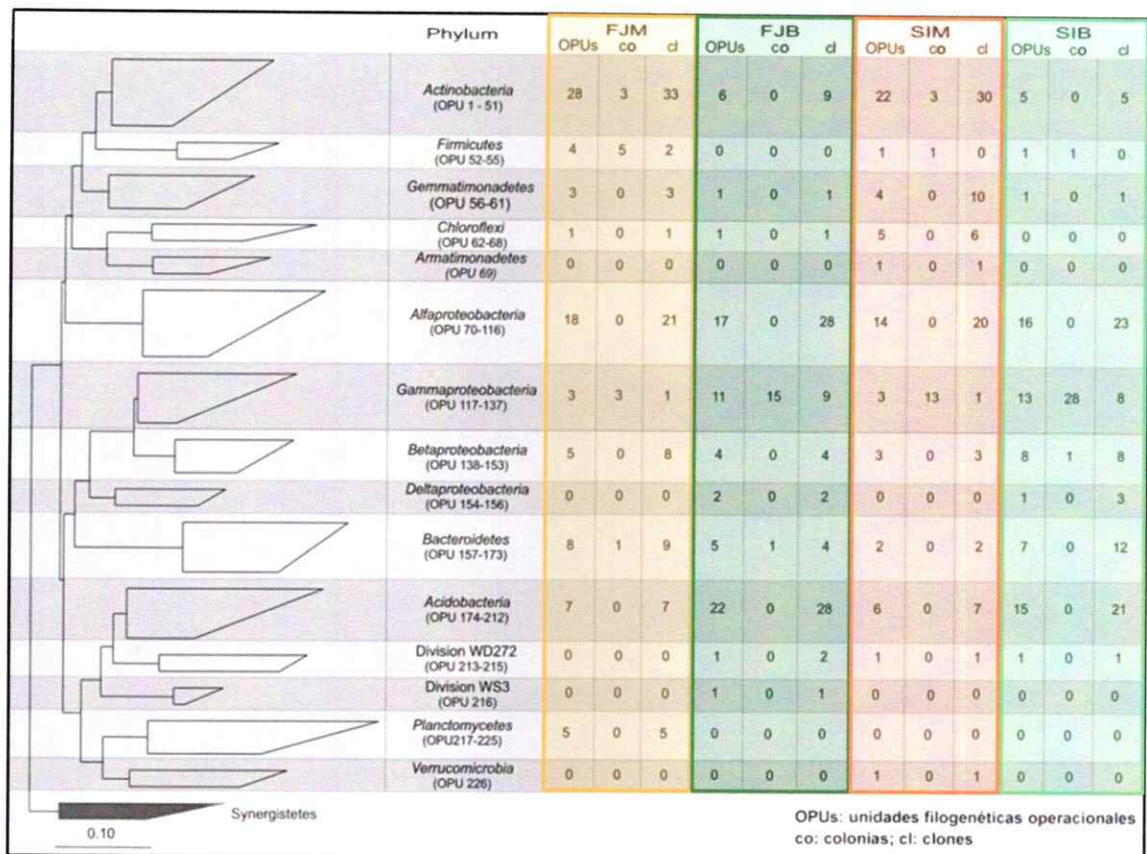




**Figura 8.** Agrupamiento de las secuencias del gen del rRNA 16S obtenidas desde las colonias de bacterias con actividad antagónica y desde las bases de datos SILVA y LTP. El árbol se generó utilizando el método de corrección de Jukes & Cantor y la topología se infirió mediante el algoritmo de Neighbor Joining. Como raíz se utilizó el grupo Synergistetes. OPU: unidad filogenética operacional. N: número de secuencias asociadas a una OPU. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

Al comparar las composiciones de cada sitio a nivel de OPU, se observó que de los 226 grupos definidos en el árbol filogenético de colonias y clones, solo 2 OPU (OPUs 7 y 52) se detectaron mediante ambas aproximaciones. Luego, 205 OPU fueron exclusivas de las librerías génicas y 19 OPU fueron determinadas exclusivamente por la metodología dependiente de cultivo.

Por otra parte, al evaluar la composición obtenida por ambas aproximaciones a nivel de filos (y clases en el caso de *Proteobacteria*), es decir, la diversidad filogenética de secuencias proveniente de colonias (co) y clones (cl) (Figura 9), se observa que todas las secuencias obtenidas por ambos métodos se distribuyen en 15 grupos. *Gamma-proteobacteria* está ampliamente distribuida a través de los 4 sitios muestreados, *Armatimonadetes* y *Verrucomicrobia* se recuperaron exclusivamente de SIM, mientras que la genoteca desde FJB fue la única que incluyó a representantes de la división WS3.

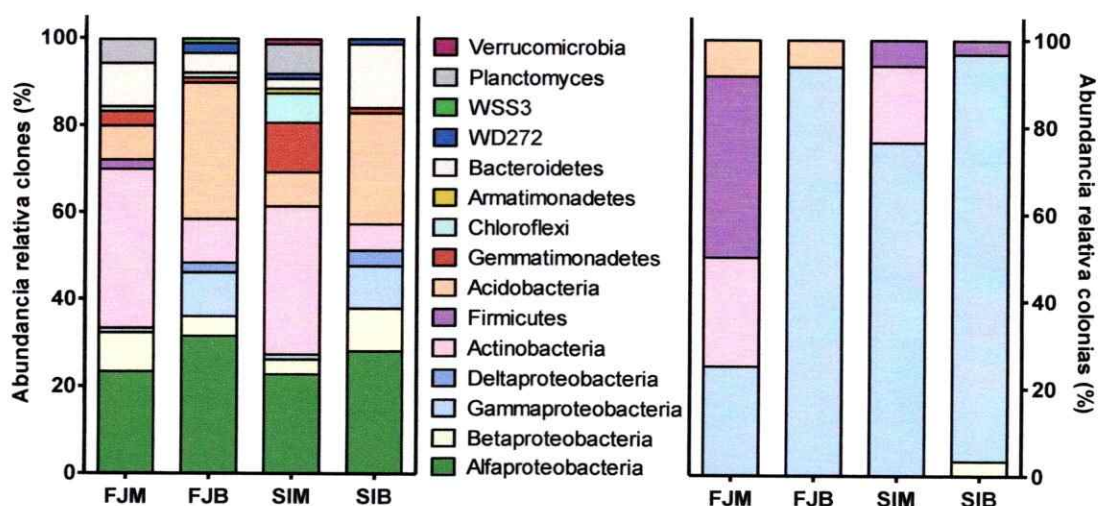


**Figura 9.** Agrupamiento de las secuencias del gen del rRNA 16S obtenidas desde las colonias de bacterias con actividad antagónica, desde los clones de las librerías génicas y desde las bases de datos SILVA y LTP. El árbol se generó utilizando el método de corrección de Jukes & Cantor y la topología se infirió mediante el algoritmo de Neighbor Joining. Como raíz se utilizó el grupo *Synergistetes*. OPU: unidad filogenética operacional, co: colonias, cl: clones. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

En resumen, las secuencias obtenidas desde las colonias de los aislados presentaron representantes de 5 grupos bacterianos (filos y clases) (Figura 10), observándose que la distribución de las OPUs presenta un patrón único para cada sitio muestreado, existiendo mayor similitud entre los bosques. Por su parte, las secuencias obtenidas desde los clones se agruparon en 15 grupos bacterianos (filos y clases) (Figura 10), 7 grupos se encontraron compartidos por las 4 comunidades (*Alfa-*

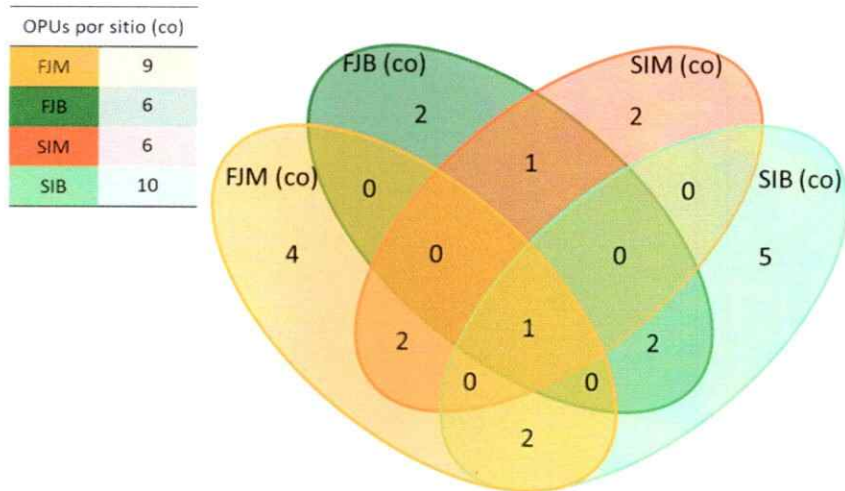
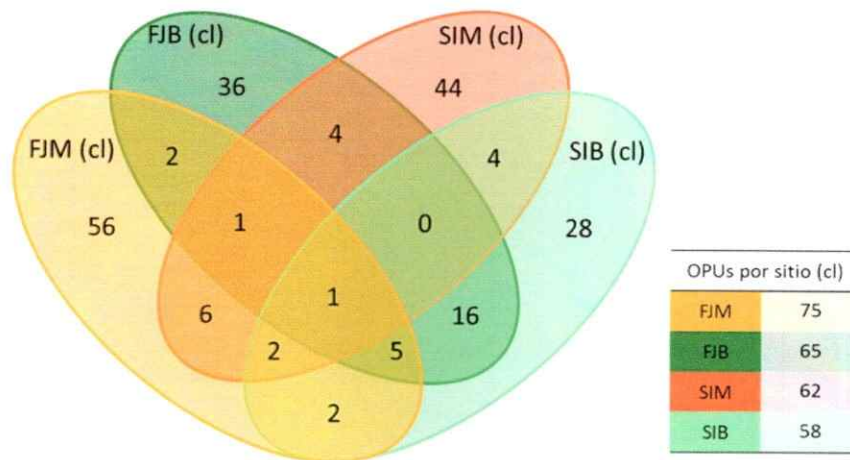


*proteobacteria*, *Beta-proteobacteria*, *Gamma-proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Bacteroidetes*), aunque en diferentes proporciones. También se identificaron secuencias asociadas a grupos bacterianos exclusivos de un determinado sitio de muestreo; es así como sólo en la librería génica de FJM se determinó la presencia de *Firmicutes*, en FJB la de *WS3* y en SIM las de *Armatimonadetes* y *Verrucomicrobia*. Al analizar la composición por tipo de suelo, se observa que en los bosques de ambas localidades fueron más abundantes las *Acidobacteria* y las *Gamma-proteobacteria* en comparación con los grupos detectados en las matrices, y de manera exclusiva en bosques se detectó la presencia de *Delta-proteobacteria*. Por su parte, en las matrices el filo *Actinobacteria* fue más abundante que en los bosques y el filo *Planctomyces* se detectó exclusivamente en este tipo de suelo.



**Figura 10.** Abundancia relativa de cada grupo bacteriano (filos y clases) medida a partir de la identificación de las OPU de los clones (izquierda) y las colonias (derecha) obtenidos desde las comunidades edáficas. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

Finalmente, si se considera el número de OPUs rescatadas por la metodología dependiente de cultivo (Figura 11, abajo), se observa que de las 21 OPUs identificadas, 13 no son compartidas entre los sitios muestreados, mientras que solo 1 OPU es compartida por los 4 sitios estudiados, la cual se asoció a la especie *Pseudomonas jessenii* (>98,6% identidad). Al evaluar las OPUs compartidas, se observa que hay 2 que comparten los bosques, las que se asociaron a *Yersinia ruckeri* (> 96,2% identidad) y *Stenotrophomonas rhizophila* (>98,8 de identidad); y 2 que comparten las matrices, las que se asociaron a *Streptomyces enissocaesilis* (>99,1% de identidad) y *Bacillus simplex* (>99,6% de identidad). Por su parte, considerando la clasificación a nivel de OPUs obtenidas desde los clones (Figura 11, arriba) , se detectó un patrón de distribución localizado, con un número menor de OPUs compartidas entre los diferentes sitios de muestreo y solo un grupo cosmopolita (compartida por todos los sitios), la que se asoció a una bacteria de suelo no cultivable del orden *Rhodospirillales* (Alfa-proteobacteria). Al analizar las OPUs comunes, se observó que el mayor número de ellas se comparte entre las muestras del mismo tipo de suelo, compartiéndose exclusivamente 16 entre los bosques y 6 entre las matrices. Sólo aparecen 2 OPUs exclusivas en común entre el bosque y la matriz del Parque Nacional Fray Jorge, las que se asociaron a bacterias no cultivables de suelo, una del orden *Gaiellales* y otra al género *Granulicella*. En el Cerro Santa Inés, fueron 4 las OPUs compartidas exclusivamente entre el bosque y la matriz, asociadas a una bacteria no cultivable del orden *Gaiellales* y a 3 bacterias cultivables de los géneros *Burkholderia*, *Solibius* y de la familia *Ferruginibacter*.



**Figura 11.** Diagramas de Venn realizados con el número de OPUs determinadas a partir de los clones (arriba) y colonias (abajo) en el análisis de composición de las comunidades bacterianas. OPU: unidad filogenética operacional. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

### 3.2.3. Influencia de las variables edáficas y geográficas sobre la composición de las comunidades bacterianas edáficas

En un análisis multivariado de redundancia (RDA) donde se correlacionó la composición de las comunidades bacterianas edáficas (colonias y clones) con las variables edáficas y geográficas de los diferentes sitios, se observó que las muestras presentan una distribución dependiente de la aproximación utilizada (Figura 12). De un total de 10 variables explicativas (pH + CH + MO + Nitrato + Amonio + x + y + x<sup>2</sup> + xy + y<sup>2</sup>) se seleccionaron aquellas que significativamente explicaban la composición (Tabla 3).

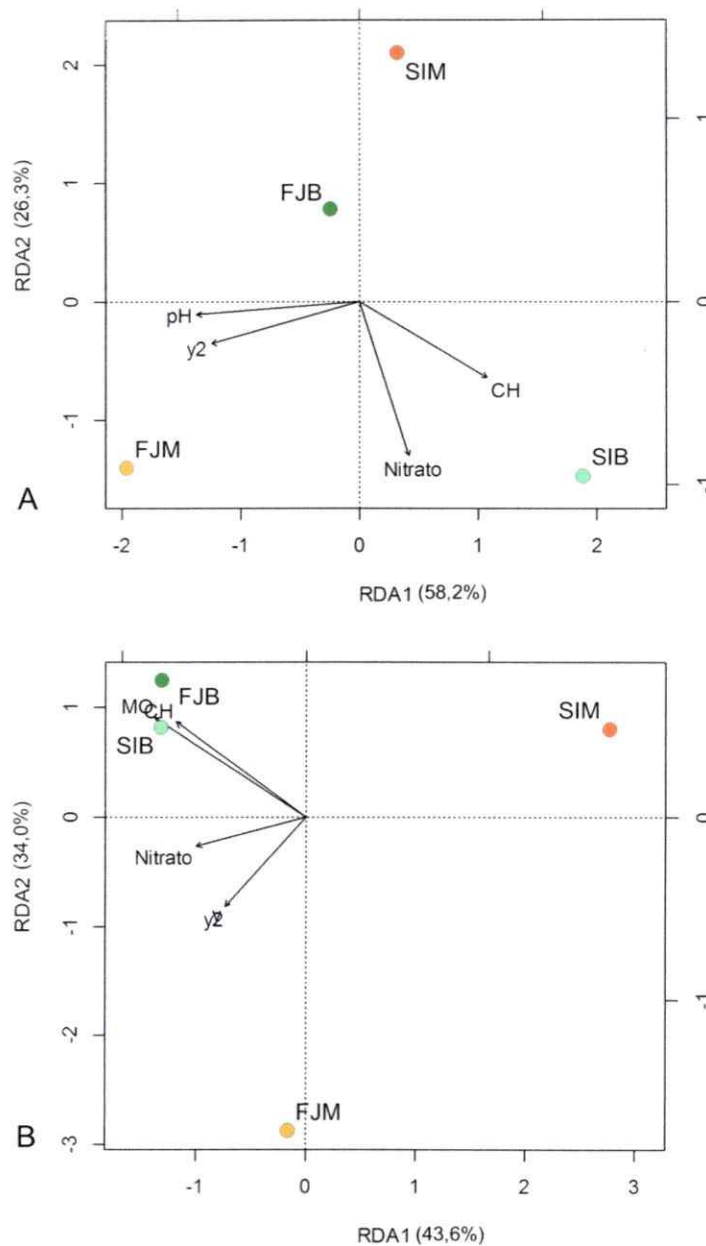
En el caso de la composición de las colonias (Figura 12A), se observa que los ejes graficados acumulan un 84,5% de la varianza total, donde las 4 comunidades se separan independientemente en ambos ejes. A lo largo del eje 1 se separan las regiones (Fray Jorge y Santa Inés), siendo las variables que tuvieron significativamente mayor peso las variables edáficas pH (-0,8957,  $p=0,001$ ) y CH (0,6984,  $p=0,007$ ), y la coordenada geográfica calculada y<sup>2</sup> (-0,8128,  $p=0,002$ ). Mientras que a lo largo del eje 2, se separan los hábitats (matrices y bosques), siendo la variable que tuvo significativamente mayor peso el Nitrato (-0,8456,  $p=0,001$ ) (Tabla 3, RDA colonias).

En el caso de la composición de los clones (Figura 12B), se observa que los ejes graficados acumulan un 77,6% de la varianza total, separándose principalmente las matrices entre sí y quedando los bosques más cercanos en la distribución. A lo largo del eje 1 se separan los hábitats (matrices y bosques), siendo las variables que tuvieron significativamente mayor peso el CH (-0,7096,  $p=0,001$ ) y la MO (-0,8217,  $p=0,001$ ). Mientras que a lo largo del eje 2 se separan las matrices, siendo la variable

que tuvo significativamente mayor peso nuevamente la MO (0,5422,  $p=0,001$ ) (Tabla 3, RDA clones).

Tras analizar los datos de ambos análisis de redundancia (clones y colonias), se observó que todas las variables edáficas y geográficas incluidas mostraron significancia estadística; y a su vez, tanto el modelo total de asociación como la totalidad de los ejes fueron estadísticamente significativos ( $p=0,001$ ) (Tabla 3).





**Figura 12.** Análisis de redundancia (RDA) entre la composición taxonómica de las comunidades bacterianas y las variables explicativas (edáficas y geográficas) seleccionadas. Los gráficos corresponden a los datos de composición de A) Colonias y B) Clones a los que se les aplicó la transformación de Hellinger. Todos los vectores son significativos. CH: Contenido Hídrico, MO: Materia Orgánica, Coordenas geográficas: y, y<sup>2</sup>. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

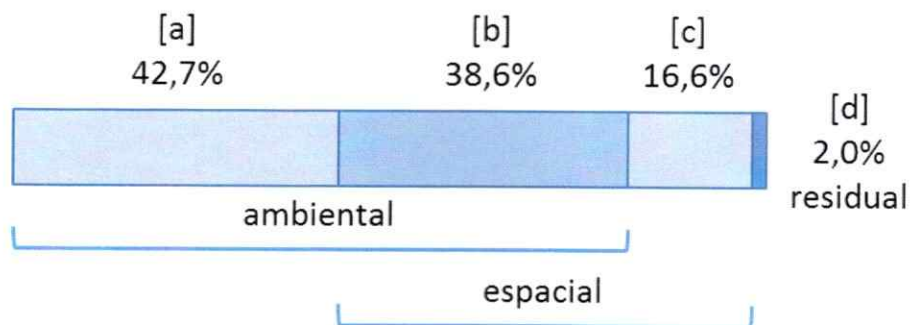
**Tabla 3.** Coeficientes de redundancia de las variables explicativas (edáficas y geográficas) para los dos primeros ejes (RDA1 y RDA2) del ordenamiento basado en la composición de colonias y clones determinada utilizando el marcador 16S RNA. Se indican en negrita las relaciones estadísticamente significativas.

Variables Explicativas	RDA colonias			RDA clones		
	RDA1	RDA2	<i>p</i>	RDA1	RDA2	<i>p</i>
pH	-0,8947	-0,0724	<b>0,001</b>	-	-	-
CH	0,6984	-0,4168	<b>0,007</b>	-0,7096	0,5172	<b>0,001</b>
MÓ	-	-	-	-0,8217	0,5422	<b>0,001</b>
Nitrato	0,2681	-0,8456	<b>0,001</b>	-0,5963	-0,1609	<b>0,001</b>
y	-	-	-	-0,4413	-0,4900	<b>0,001</b>
y <sup>2</sup>	-0,8128	0,2314	<b>0,002</b>	-0,4414	-0,4900	<b>0,001</b>
Varianza total (%)	58,2	26,3	-	43,6	34,0	-
Análisis de significancia	Primer eje		<b>0,001</b>	Primer eje		<b>0,001</b>
	Todos los ejes		<b>0,001</b>	Todos los ejes		<b>0,001</b>

Finalmente, y utilizando la partición de la varianza obtenida en los análisis de RDA de composición (colonias y clones), se procedió a cuantificar la varianza explicada por factores geográficos (espacial) o edáficos (ambiental).

En la Figura 13 se observa que la variación de la composición de las comunidades bacterianas se explica en un 98,0% (a+b+c,  $R_a^2=0,980$ ,  $p=0,001$ ). En particular, el 42,7% de la variación encontrada se explica solo por variables edáficas (a,  $R_a^2=0,427$ ,  $p=0,004$ ) y un 16,6% se explica solo por variables geográficas (c,  $R_a^2=0,116$ ,  $p=0,001$ ), mientras que en conjunto, las variables edáficas y geográficas explican el 38,6% de la variación observada en la comunidad. Por lo tanto, el ambiente explica en total un 81,3% de la varianza (a+b,  $R_a^2=0,814$ ,  $p=0,001$ ), mientras que la influencia geográfica alcanza un 55,2% (b+c,  $R_a^2=0,552$ ;  $p=0,001$ ). En resumen, la mayor parte de la

variación es explicada por variables ambientales, pero con una fuerte influencia de las variables geográficas; sin embargo, un 2% de la variación de la comunidad no se explica por las variables explicativas incluidas en el análisis.



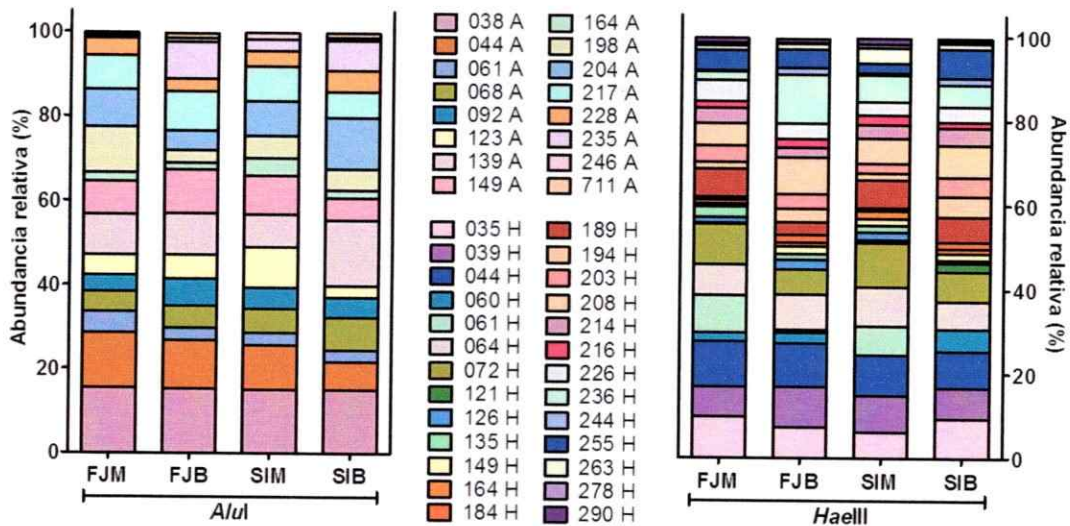
**Figura 13.** Partición de la variación de la composición determinada por la influencia de variables edáficas (ambiental) y geográficas (espacial). La caja representa el 100% de la variación total de la composición. Las fracciones reportadas corresponden a los  $R^2$  ajustados relativos al 100%. Se muestran los componentes de la varianza puramente ambiental [a], ambiental estructurado espacialmente [b], puramente espacial [c] y residual [d].

### 3.3. Estructura de las comunidades bacterianas edáficas

#### 3.3.1. Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción terminales (TRFLP)

En el análisis de perfiles de restricción del marcador rRNA 16S (Figura 14) se obtuvo un total de 42 TRFs. De éstos, 16 fueron generados con la enzima *Acl* y 36 con la enzima *HaeIII*. Gran parte de los TRFs determinados por esta técnica estuvieron presentes en todas las comunidades analizadas, detectándose entre ellas diferencias de abundancia.

En el caso de la enzima *AluI*, se detectó que el TRF de 711 pb sólo está presente en los bosques en ambas localidades analizadas (FJB y SIB); mientras que con la enzima *HaeIII*, se detectó que los TRFs de 61 y 135 pb están ausentes en el bosque de Santa Inés (SIB).



**Figura 14.** Abundancia relativa de la fluorescencia de cada TRF obtenido desde las comunidades muestreadas. Se indica en la figura la enzima de restricción utilizada para cada perfil obtenido (A, *AluI*; H: *HaeIII*). Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

Al estimar la riqueza, diversidad y equidad de las comunidades bacterianas (Tabla 4), no se observaron diferencias significativas entre las distintas comunidades respecto a los parámetros evaluados.

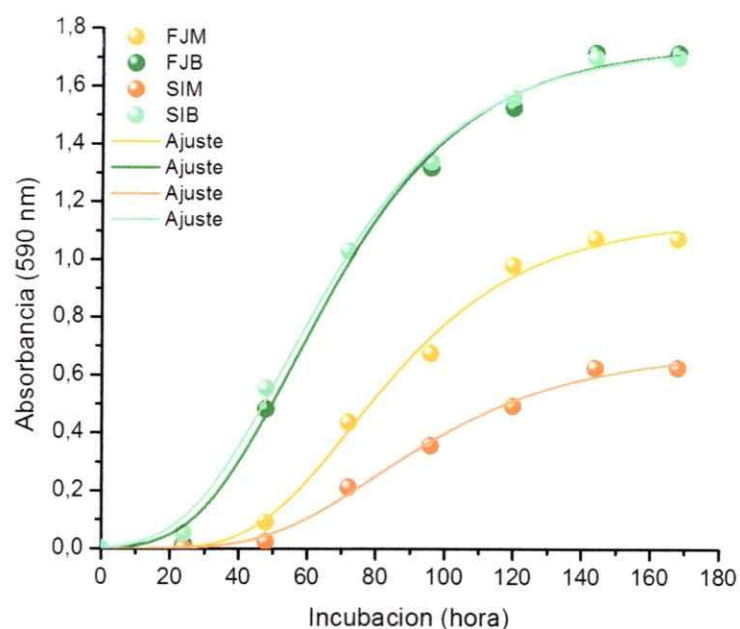
**Tabla 4.** Índices de diversidad ( $\pm$  error estándar) calculados utilizando los datos de los TRFs (pares de bases y fluorescencia) para cada una de las comunidades. Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la no superposición de los intervalos de confianza luego de 10.000 re-muestreos al azar. Cada sitio muestreado se representó con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

	FJM	FJB	SIM	SIB
Riqueza	37,6 $\pm$ 1,20 (a)	38,3 $\pm$ 0,66 (a)	38,0 $\pm$ 1,00 (a)	38,0 $\pm$ 0,57 (a)
Diversidad	3,29 $\pm$ 0,04 (a)	3,32 $\pm$ 0,07 (ab)	3,38 $\pm$ 0,03 (ab)	3,36 $\pm$ 0,01 (b)
Equidad	0,70 $\pm$ 0,01 (a)	0,80 $\pm$ 0,04 (ab)	0,80 $\pm$ 0,01 (b)	0,70 $\pm$ 0,01 (ab)

### 3.3.2. Perfiles metabólicos a nivel comunitario (CLPP)

Con el objetivo de evaluar la diversidad metabólica potencial de las comunidades bacterianas presentes en el suelo se analizó su capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono disponibles en las placas Ecoplate™ (BIOLOG®)

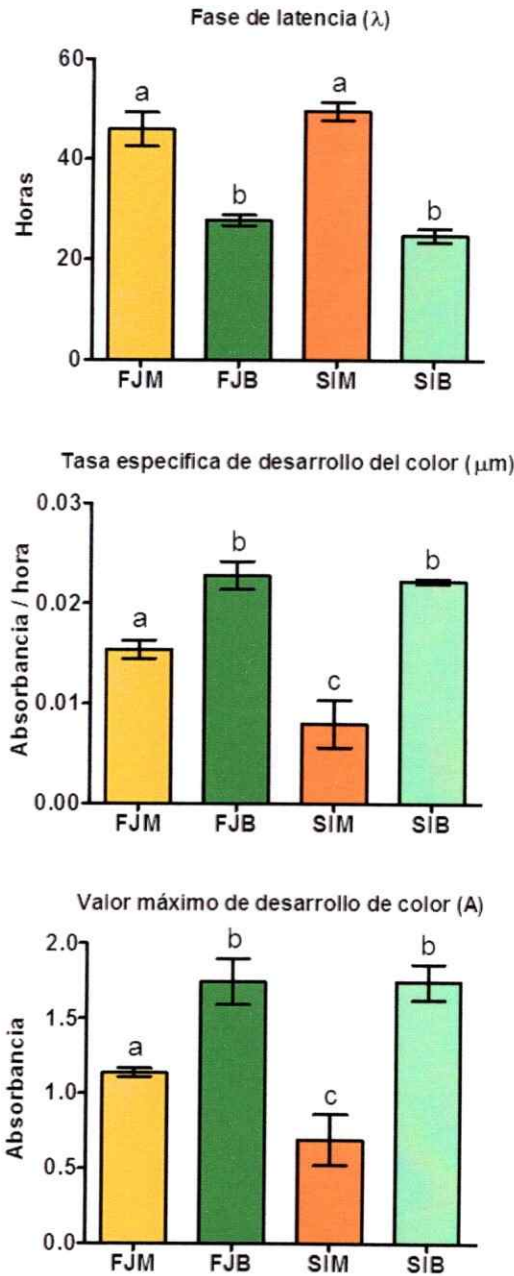
Tras una semana de incubación de las comunidades en presencia de cada una de las 31 fuentes de carbono, se observa que el uso de éstas presentó características únicas para cada comunidad proveniente de los 4 sitios. Como se aprecia en la Figura 15, tras el ajuste de las cinéticas metabólicas, las comunidades presentes en los bosques poseen un comportamiento similar entre sí, pero diferente al de las matrices aledañas, teniendo estas últimas incluso características diferenciales entre ellas.



**Figura 15.** Cinéticas metabólicas a partir de las mediciones de absorbancia producida por la utilización de las fuentes de carbono en las placas Ecoplate™ (BIOLOG®) inoculadas con una suspensión de las muestras de suelo. Las curvas se ajustaron a la ecuación de Gompertz modificada. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

Al calcular los parámetros cinéticos de las curvas (Figura 16), se puede observar que la fase de latencia ( $\lambda$ ) de las matrices es significativamente mayor que la de los bosques; mientras que la tasa de desarrollo de color o tasa de consumo de fuentes de carbono ( $\mu$ m), es significativamente mayor en los bosques que en las matrices, observándose también diferencias en las tasas de consumo de las matrices al compararlas entre sí. Finalmente, al analizar el desarrollo máximo de consumo o desarrollo de color ( $A$ ), destacan los bosques con valores significativamente mayores que las matrices.





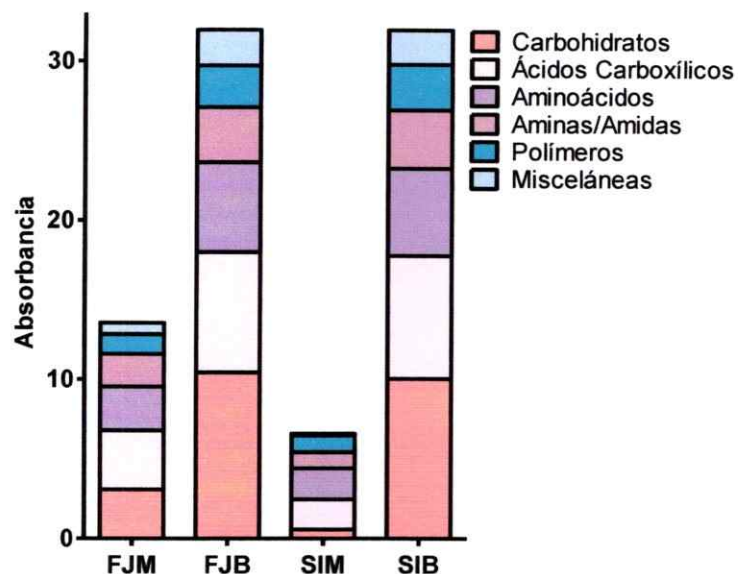
**Figura 16.** Parámetros cinéticos de las curvas medidas para las comunidades edáficas, según el ajuste a la ecuación de Gompertz modificada. Las barras de error corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la no superposición de los intervalos de confianza luego de 10.000 remuestreos al azar. Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.



Tras evaluar la cinética de consumo de las fuentes de carbono, se determinó que a las 72 h las cuatro comunidades se encontraban en fase exponencial, por lo que los datos de absorbancia obtenidos en ese momento se utilizaron para llevar a cabo los análisis comparativos de los CLPP de las muestras.

Al comparar el consumo por categorías de acuerdo a la estructura química de las fuentes de carbono utilizadas a las 72 h, se observa que todas las comunidades son capaces de consumir al menos una de las fuentes de carbono de cada tipo de estructura química (Figura 17). La matriz y el bosque de Fray Jorge presentaron diferencias significativas en el uso de carbohidratos; asimismo, la matriz y el bosque de Santa Inés no sólo presentaron diferencias significativas en el consumo de los carbohidratos sino que también en los ácidos carboxílicos, polímeros y aminas. Sin embargo, no existieron diferencias significativas en el uso de las diferentes categorías de fuentes de carbono cuando se comparan los bosques o las matrices entre sí.





**Figura 17.** Consumo de fuentes de carbono clasificadas por categoría por parte de las comunidades edáficas. La absorbancia en las placas se midió en la fase de crecimiento exponencial de las comunidades (72 h). Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

Al analizar cuáles fueron las fuentes de carbono que preferentemente utilizó cada tipo de comunidad, se pudo determinar que sólo las comunidades presentes en los bosques fueron capaces de metabolizar los carbohidratos  $\beta$ -metil-D-glucósido, l-eritritol,  $\alpha$ -D-lactosa y el ácido- $\gamma$ -hidroxibutírico. Además, se observó, en promedio, mayor consumo en los bosques de las fuentes de carbono D-celobiosa, D-xilosa, D-manitol y N-acetil-D-glucosamina (carbohidratos); ácido D-galactónico,  $\gamma$ -lactona, ácido D-galacturónico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido-D-glucosamínico y ácido itacónico (ácido carboxílicos); L-arginina, L-asparagina, L-serina y ácido glicil-L-glutámico (amino ácidos); putresina y fenilatilamina (aminas); tween40, tween 80,  $\alpha$ -ciclodextrina y glicógeno (polímeros); y glucosa-1-fosfato, ácido metil-éster pirúvico y D,L- $\alpha$ -glicerol-fosfato (misceláneas). En general, las comunidades presentes en los bosques poseen

la capacidad de metabolizar un número significativamente mayor de fuentes de carbono (Riqueza), poseen significativamente mayor diversidad metabólica (Diversidad) y significativamente mayor equidad que las comunidades presentes en las matrices (Tabla 5). Sin embargo, no se observaron diferencias cuando se compararon los bosques o las matrices entre sí, a excepción de los bosques al evaluar la equidad.

**Tabla 5.** Índices de diversidad ( $\pm$  error estándar) calculados utilizando los valores de absorbancia detectados a las 72 horas de incubación de las comunidades en presencia de cada una de las fuentes de carbono. Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la no superposición de los intervalos de confianza luego de 10.000 re-muestreos al azar. Cada sitio muestreado se representó con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

	FJM	FJB	SIM	SIB
Riqueza	18,6 $\pm$ 1,33 (a)	27,3 $\pm$ 0,66 (b)	13,3 $\pm$ 3,18 (a)	27,3 $\pm$ 0,66 (b)
Diversidad	2,69 $\pm$ 0,09 (a)	3,17 $\pm$ 0,03 (b)	2,26 $\pm$ 0,29 (a)	3,21 $\pm$ 0,02 (b)
Equidad	0,70 $\pm$ 0,02 (a)	0,80 $\pm$ 0,01 (b)	0,70 $\pm$ 0,01 (a)	0,90 $\pm$ 0,01 (c)

### 3.3.3. Influencia de las variables edáficas y geográficas sobre la estructura de las comunidades bacterianas

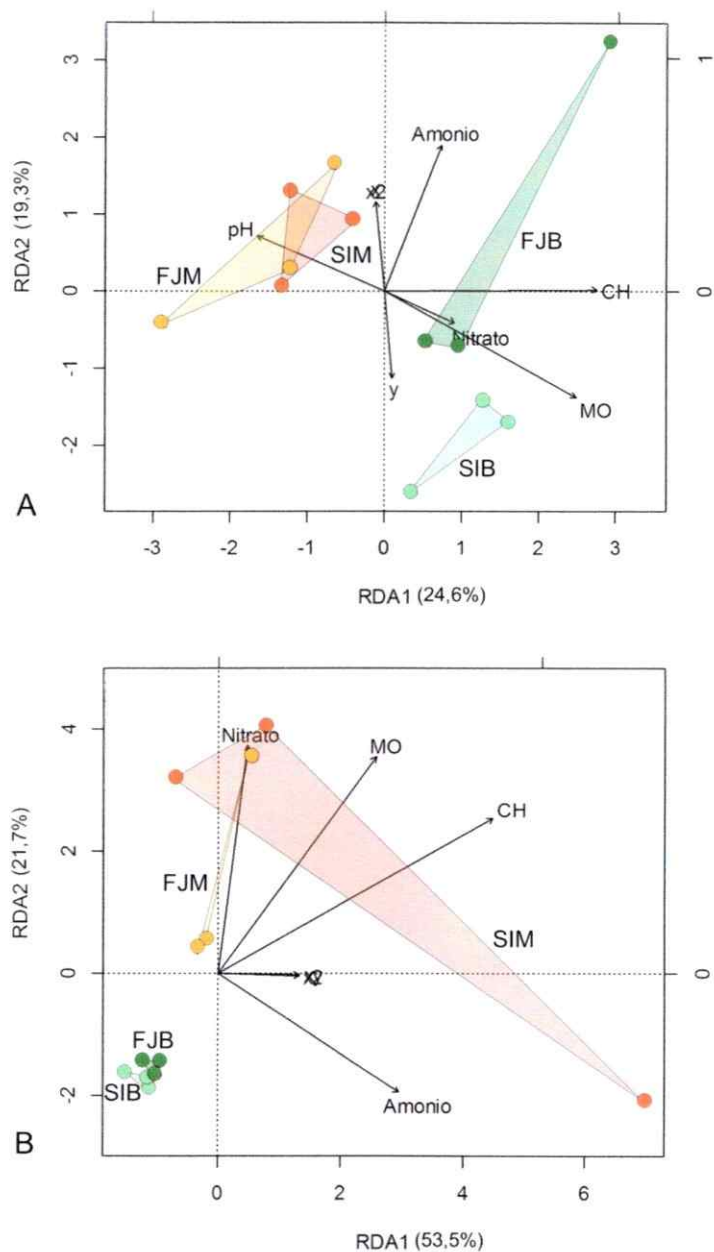
En un análisis multivariado de redundancia (RDA) donde se correlacionó la estructura de las comunidades bacterianas edáficas (TRFLP y CLPP) con las variables edáficas y geográficas de los diferentes sitios, se observó que la principal separación se produce entre hábitats (bosques y matrices) (Figura 18). De un total de 10 variables explicativas (pH + CH + MO + Nitrato + Amonio + x + y + x<sup>2</sup> + xy + y<sup>2</sup>) se seleccionaron aquellas que significativamente explicaban la estructura (Tabla 6).

En el caso de la estructura genética (perfiles de TRFLP) (Figura 18-A), se observa que los ejes graficados acumulan un 43,9% de la varianza total, separándose

principalmente los bosques de las las matrices y manteniéndose éstas más cercanas en la distribución. A lo largo del eje 1 se separan los hábitats (matrices y bosques), siendo las variables que tuvieron significativamente mayor peso el CH (0,9096,  $p=0,014$ ) y la MO (0,8214,  $p=0,037$ ) (Tabla 6, RDA TRFLP). Mientras que a lo largo del eje 2, se separan los bosques entre sí y se superponen las matrices.

El el caso de la estructura metabólica (perfiles de CLPP) (Figura 18-B), se observa que los ejes acumulan un 75,2% de la varianza total, separándose principalmente las matrices de los bosques, siendo las réplica de estos últimos más similares entre sí. A lo largo de ambos ejes se separan los hábitats (matrices y bosques), siendo las variables que tuvieron significativamente mayor peso sobre el eje 1 el CH (0,8463,  $p=0,001$ ) y el Amonio (0,5571,  $p=0,010$ ), y sobre el eje 2 el Nitrato (0,7059,  $p=0,004$ ) y la MO (0,6715,  $p=0,001$ ) (Tabla 6, RDA CLPP).

Tras analizar los datos de ambos análisis de redundancia (TRFLP y CLPP), se observó que la mayoría de las variables explicativas incluidas mostraron significancia estadística; y a su vez, tanto el modelo total de asociación como los ejes fueron estadísticamente significativos ( $p=0,001$ ) (Tabla 6).



**Figura 18.** Análisis de redundancia (RDA) entre la estructura de las comunidades bacterianas y las variables explicativas (edáficas y geográficas) seleccionadas. Los gráficos corresponden a los datos de estructura de A) TRFLP y B) CLPP. CH: Contenido Hídrico, MO: Materia Orgánica, Coordenas geográficas: x, y, xy,  $x^2$ . Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

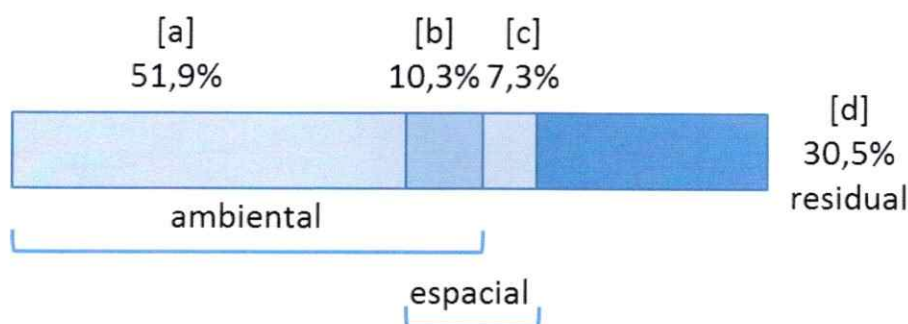
**Tabla 6.** Coeficientes de redundancia de las variables explicativas (edáficas y geográficas) para los dos primeros ejes (RDA1 y RDA2) del ordenamiento basado en la estructura genética y metabólica determinada utilizando TRFLP y CLPP, respectivamente. Se indican en negrita las relaciones estadísticamente significativas.

Variables Explicativas	RDA TRFLP			RDA CLPP		
	RDA1	RDA2	<i>p</i>	RDA1	RDA2	<i>p</i>
pH	-0,5451	0,2342	0,130	-	-	-
CH	0,9096	0,0516	<b>0,014</b>	0,8463	0,4809	<b>0,001</b>
MO	0,8214	-0,4565	<b>0,037</b>	0,4855	0,6715	<b>0,001</b>
Amonio	0,2422	0,6293	0,318	0,5571	-0,3670	<b>0,010</b>
Nitrato	0,2994	-0,1395	0,276	0,0904	0,7059	<b>0,004</b>
x	-0,0361	0,3839	0,852	-	-	-
y	0,0342	-0,3759	0,513	-	-	-
xy	-	-	-	0,2499	-0,0082	0,129
x <sup>2</sup>	-0,0358	0,3836	0,529	0,2492	-0,0056	0,075
Varianza total (%)	24,6	19,3	-	53,5	21,7	-
Análisis de significancia	Primer eje		<b>0,001</b>	Primer eje		<b>0,001</b>
	Todos los ejes		0,106	Todos los ejes		<b>0,001</b>

Finalmente, utilizando la partición de la varianza obtenida en los análisis de RDA de estructura (TRFLP y CLPP), se procedió a cuantificar la varianza explicada por factores geográficos (espacial) o edáficos (ambiental).

En la Figura 19 se observa que la variación de la estructura de las comunidades bacterianas se explica en un 69,4% (a+b+c,  $R_a^2=0,694$ ,  $p=0,002$ ). En particular, el 51,9% de la variación encontrada se explica solo por variables edáficas (a,  $R_a^2=0,519$ ,  $p=0,009$ ) y un 7,3% se explica solo por variables geográficas (c,  $R_a^2=0,073$ ,  $p=0,123$ ), mientras que en conjunto, las variables edáficas y geográficas explican el 10,3% de la variación observada en la comunidad. Por lo tanto, el ambiente explica en total un

62,2% de la varianza ( $a+b$ ,  $R_a^2=0,622$ ,  $p=0,001$ ), mientras que la influencia geográfica alcanza un 17,6% ( $b+c$ ,  $R_a^2=0,176$ ,  $p=0,059$ ). En resumen, la mayor parte de la variación es explicada por variables ambientales, pero con influencia de las variables geográficas; sin embargo, un 30,5% de la variación de la comunidad no se explica por las variables explicativas incluidas en el análisis.



**Figura 19.** Partición de la variación de la estructura determinada por la influencia de variables edáficas (ambiental) y geográficas (espacial). La caja representa el 100% de la variación total de la estructura. Las fracciones reportadas corresponden a los  $R^2$  ajustados relativos al 100%. Se muestran los componentes de la varianza puramente ambiental [a], ambiental estructurado espacialmente [b], y puramente espacial [c] y residual [d].

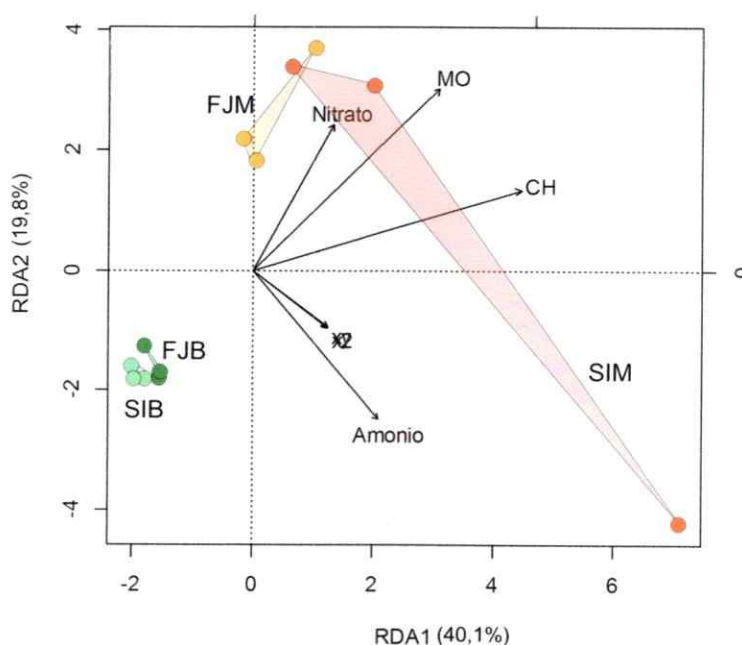
### 3.4. Influencia de las variables edáficas y geográficas sobre la diversidad de las comunidades bacterianas edáficas

Con el objeto de analizar la diversidad de las comunidades bacterianas edáficas como un conjunto, se realizó un análisis multivariado de redundancia (RDA) donde se correlacionaron, en conjunto, los datos de composición (clones y colonias) y de estructura (TRFLP y CLPP) con las variables edáficas y geográficas de los diferentes sitios (Figura 20). De un total de 10 variables explicativas ( $pH + CH + MO + \text{Nitrato} + \text{Amonio} + x + y + x^2 + xy + y^2$ ) se seleccionaron aquellas que significativamente explicaban la diversidad (Tabla 7).



En la Figura 20 se observa que los ejes graficados acumulan un 59,9% de la varianza total, y que se separan principalmente los bosques de las matrices a lo largo de ambos ejes, siendo las réplicas de los bosques más similares entre sí.

A lo largo del eje 1 las variables que tuvieron significativamente mayor peso fueron el CH (0,9509,  $p=0,001$ ) y la MO (0,6604,  $p=0,001$ ); mientras que a lo largo del eje 2 las variables que tuvieron significativamente mayor peso fueron, nuevamente la MO (0,6429,  $p=0,001$ ), y el Nitrato (0,5152,  $p=0,001$ ) y el Amonio (-0,5298,  $p=0,001$ ) (Tabla 7).



**Figura 20.** Análisis de redundancia (RDA) entre la diversidad (estructura y composición) de las comunidades bacterianas y las variables explicativas (edáficas y geográficas) seleccionadas. Los gráficos corresponden a los datos de composición (clones+colonias) y de estructura (TRFLP+CLPP). CH: Contenido Hídrico, MO: Materia Orgánica, Coordenas geográficas:  $xy$ ,  $x^2$ . Cada sitio muestreado se representa con sus iniciales: FJM, Fray Jorge Matriz; FJB, Fray Jorge Bosque; SIM, Santa Inés Matriz; SIB, Santa Inés Bosque.

Por lo tanto, la mayoría de las variables edáficas incluidas mostraron significancia estadística; y a su vez, tanto el modelo total de asociación como los primeros ejes fueron estadísticamente significativos ( $p=0,001$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Coeficientes de redundancia de las variables explicativas (edáficas y geográficas) para los dos primeros ejes (RDA1 y RDA2) del ordenamiento basado en la diversidad (estructura y composición) de las comunidades bacterianas. Se indican en negrita las relaciones estadísticamente significativas.

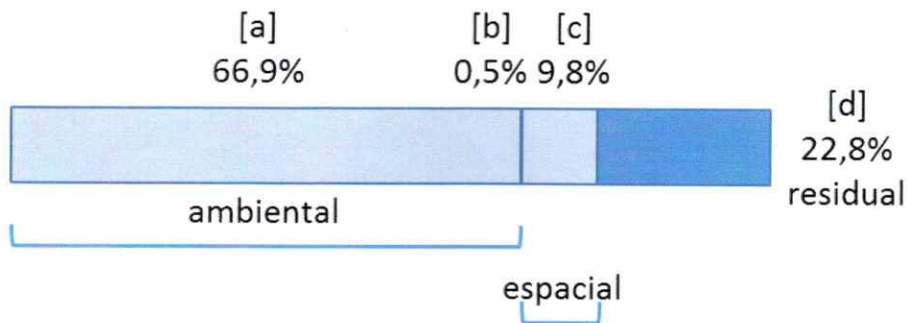
Variables Explicativas	RDA1	RDA2	<i>p</i>
CH	0,9509	0,2847	<b>0,001</b>
MO	0,6604	0,6429	<b>0,001</b>
Nitrato	0,2853	0,5152	<b>0,001</b>
Amonio	0,2446	-0,5298	<b>0,001</b>
xy	0,2655	-0,2041	<b>0,016</b>
$x^2$	0,2654	-0,2006	0,086
Varianza total (%)	40,1	19,8	-
Análisis de significancia	Primer eje		<b>0,001</b>
	Todos los ejes		<b>0,001</b>

Finalmente, utilizando la partición de la varianza obtenida en el análisis de RDA de diversidad (composición y estructura), se procedió a cuantificar la varianza explicada por factores geográficos (espacial) o edáficos (ambiental).

En la Figura 21 se observa que la variación de la diversidad de las comunidades bacterianas se explica en un 77,2% ( $a+b+c$ ,  $R_a^2=0,772$ ,  $p=0,001$ ). En particular, el 66,9% de la variación encontrada se explica solo por variables edáficas ( $a$ ,  $R_a^2=0,669$ ,  $p=0,001$ ) y un 9,8% se explica solo por variables geográficas ( $c$ ,  $R_a^2=0,098$ ,  $p=0,015$ ), mientras que en conjunto, las variables edáficas y geográficas explican el 0,5% de la variación observada en la comunidad. Por lo tanto, el ambiente explica en total un



67,4% de la varianza ( $a+b$ ,  $R_a^2=0,674$ ,  $p=0,001$ ), mientras que la influencia geográfica alcanza un 10,3% ( $b+c$ ,  $R_a^2=0,103$ ,  $p=0,077$ ). En resumen, la mayor parte de la variación es explicada por variables ambientales, pero con cierta influencia de las variables geográficas; sin embargo, un 22,8% de la variación de la comunidad no se explica por las variables explicativas incluidas en el análisis.



**Figura 21.** Partición de la variación de la diversidad determinada por la influencia de variables edáficas (ambiental) y geográficas (espacial). La caja representa el 100% de la variación total de la diversidad. Las fracciones reportadas corresponden a los  $R^2$  ajustados relativos al 100%. Se muestran los componentes de la varianza puramente ambiental [a], ambiental estructurado espacialmente [b], y puramente espacial [c] y residual [d].

## 4. Discusión

### 4.1. Variables explicativas: factores edáficos y geográficos

Las mejoras en las técnicas de detección microbiana han permitido aumentar nuestra comprensión sobre la diversidad microbiana sustancialmente, y han permitido acumular un amplio registro de investigación que apoya la idea de que los microorganismos libres exhiben patrones biogeográficos (Martiny y col., 2006). Principalmente se ha observado que los microorganismos poseen patrones de diversidad basados en las características de los nichos actuales y de la historia asociada al suelo (Martiny y col., 2006); por ende, gradientes físicos y químicos encontrados a lo largo de los ecosistemas, generan patrones espaciales de diversidad microbiana asociada a adaptaciones locales de microorganismos metabólicamente diversos (Nold y col., 2010; Fierer y Lennon, 2011).

Las comunidades de áreas fragmentadas de bosques de olivillos pertenecen a una comunidad que se extendió en forma continua en la costa de Chile central durante la última edad glacial del Pleistoceno (Villagrán y cols, 2004). Actualmente, debido a la separación geográfica de los fragmentos, estas áreas poseen un contraste climático, de propiedades edáficas y de composición florística único, que generan condiciones que impactarían directamente a la microbiota del suelo. Considerando las interesantes condiciones encontradas en estos suelos, y con el objeto de evaluar hipótesis biogeográficas, se analizaron las comunidades bacterianas de los suelos del bosque interior y el matorral aledaño al relicto (hábitats) del Parque Nacional Fray Jorge y al relicto del Cerro Santa Inés (regiones), separados por 200 km, los que corresponden a

suelos que han mantenido características únicas a lo largo de los años, conservando especies como fósiles vivientes que forman parte del patrimonio biológico nativo (Pérez, 1994; Francois, 2004).

Respecto a los hábitats y las condiciones actuales del suelo, fueron el pH, el contenido hídrico y la materia orgánica los factores que más influyeron sobre la separación de las comunidades bacterianas de bosques y matrices. Anteriormente ya se ha descrito que el pH es, a nivel global, un buen descriptor de la diversidad y riqueza de ensamblajes bacterianos, considerándose que los suelos con pH neutro son más diversos y que con el aumento de la acidez la diversidad disminuye (Fierer y Jackson, 2006). Sin embargo, existen también otros factores que varían entre hábitats, como el contenido hídrico y la materia orgánica en este estudio.

En los bosques de olivillos del Parque Nacional Fray Jorge y el Cerro Santa Inés, se ha descrito, a principio de los noventa, que el pH-CaCl<sub>2</sub> alcanzó valores de 4,6 y 4,4, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos (Perez y Villagran, 1994); años después, en el bosque del Parque Nacional Fray Jorge se reportó un pH-H<sub>2</sub>O de 3,8 (Guevara, 2007). Los valores descritos en esos análisis puntuales son considerablemente más ácidos que lo descrito en este trabajo. Otro trabajo, en el que se evaluó el cambio de pH en los suelos del bosque del Parque Nacional Fray Jorge durante 3 años, a distintas alturas y en diferentes estaciones del año, reportó un pH-H<sub>2</sub>O/KCl de 4,5/4,0 en invierno (junio) y un pH de 5,0/4,5 durante la primavera (septiembre) (Fernández, 2004). Si bien los cambios en pH pueden deberse a la solución acuosa utilizada durante la extracción (Minasny y col. 2011), Fernández (2004) observaron variaciones relacionadas con la temporada independientemente del medio acuoso utilizado para medir el pH. El muestreo llevado a cabo en primavera posee valores más básicos y están en el rango de los observados en este trabajo, cuyo

muestreo se llevó a cabo en el mes de agosto del 2013. Respecto a las matrices, se ha descrito que en el Parque Nacional Fray Jorge el pH del suelo alcanza valores cercanos a 5,9 (Guevara, 2007), los cuales coinciden con lo descrito en el matorral esclerófilo de Chile central (Cavieres y col., 2000) y en este trabajo.

En relación al contenido hídrico, se reporta en la literatura que el bosque del Parque Nacional Fray Jorge (FJB) presentó valores cercanos a 65,0 gramos de agua por 100 gramos de peso seco ( $\text{g H}_2\text{O}/100 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ suelo}$ ), mientras que la matriz (FJM) sólo contenía 2,0  $\text{g H}_2\text{O}/100 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ suelo}$  (Guevara, 2007), tendencia similar a la observada en este trabajo, aunque con diferencias de magnitud.

Respecto a la materia orgánica, se ha descrito que la variación entre el invierno y la primavera en el bosque del Parque Nacional Fray Jorge (FJB) fue entre 27,2-28,7% (Fernández, 2004), un porcentaje cercano a los observados en los bosques de este trabajo. En el caso de las matrices, no existen registros de medición directa de este parámetro; sin embargo, indirectamente se evaluó que en Fray Jorge el contenido de carbono es significativamente menor en matrices al compararlo con bosques y en general estaba correlacionado con la hojarasca del sitio muestreado (Guevara, 2007).

Estas diferencias en las variables edáficas (eventos actuales) y en la localización geográfica de los sitios de estudio (eventos históricos), podrían determinar la diversidad de las comunidades bacterianas que habitan los suelos de los bosques y las matrices (hábitats) del Parque Nacional Fray Jorge y el Cerro Santa Inés (regiones).

#### **4.2. Diversidad de las comunidades bacterianas edáficas: composición dependiente e independiente de cultivo**

Las secuencias obtenidas independientemente del cultivo (clones) se distribuyeron en 205 OPUs, identificándose 12 filos bacterianos; de ellos, 5

(*Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* y *Proteobacteria*) se encontraron compartidos por las 4 comunidades. En los bosques de ambas localidades predominaron las *Acidobacteria*, *Alfa-* y *Gamma-proteobacteria*, y como grupo exclusivo de bosques destacaron las *Delta-proteobacteria*. En las matrices predominaron *Actinobacteria* y el filo *Planctomycetes* se presentó como exclusivo de este tipo de suelo. Por otra parte, en la aproximación dependiente de cultivo (colonias), los 21 OPU<sub>s</sub> identificados se distribuyeron principalmente en 4 filos, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*; y solo la clase *Gamma-proteobacteria* se encontró en los 4 sitios estudiados.

En un estudio llevado a cabo en el Parque Nacional Fray Jorge, donde se comparó la composición del bosque y el matorral, se encontró un número de filos similar al identificado en este trabajo (Guevara, 2007); compartiendo los bosques 7 filos y las matrices 8 filos, pero en diferentes proporciones. Estas diferencias en abundancia pueden haberse generado principalmente por cambios en los parámetros del suelo (pH, contenido hídrico, entre otros), producto de la época del año, o el año en sí, en que se tomaron las muestras (noviembre 2004 en el caso de Guevara (2007) y agosto 2013 en el de este trabajo). Sin embargo, un estudio de biodiversidad microbiana en suelo boscoso del atlántico, mostró resultados similares a los observados en el presente trabajo (Faoro y col., 2010); en éste se observó que el filo dominante fue *Acidobacteria*, seguido por *Proteobacteria*, ambos grupos frecuentemente numerosos en muestras de suelo. Asimismo, en una revisión de la composición bacteriana determinada mediante análisis de secuenciación del gen rRNA 16S en distintos suelos, se determinó que los grupos más abundantes a nivel de filo son *Proteobacteria* y *Acidobacteria*, seguido por *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*, y en menor proporción por *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomyces* y *Gemmatimonadetes* (Janssen, 2006),

todos detectados en las muestras analizadas en el presente trabajo. Grupos como *Firmicutes* estuvieron menos representados (1,8%); sin embargo, durante mucho tiempo, con métodos tradicionales de cultivo, se consideró que *Firmicutes* era uno de los grupos más abundantes en todos los tipos de suelos (Janssen, 2006). Estas diferencias sugieren que *Firmicutes* es, en realidad, un grupo poco representado en los suelos, pero de más fácil cultivo que el resto de los grupos microbianos. No obstante, no se puede descartar que sus células y esporas sean muy difíciles de lisar por los métodos utilizados para el aislamiento de DNA y por eso son difícilmente detectables con métodos basados en técnicas moleculares independientes de cultivo (Donachie y col., 2004).

Una de las principales diferencias entre bosques y matrices, fue la mayor abundancia de *Acidobacteria* en los primeros; la información sobre este filo es muy escasa y derivada principalmente de genotecas y de unas pocas cepas cultivables (Quaiser y col., 2003). Según Sait y col. (2006), la mayoría de los miembros de este filo crecen en un rango de pH entre 4,0-5,5, siendo muy raras por encima de pH 6,5. Este dato concuerda con los resultados del presente trabajo, ya que la abundancia de clones pertenecientes a *Acidobacteria* fue mayor en los suelos cuyo pH fue significativamente más ácido.

Sin embargo, si se pretende abarcar una mayor fracción de la diversidad y evaluar propiedades en las bacterias que se están estudiando, la obtención de aislados en cultivo es imprescindible. Existen múltiples aplicaciones y características funcionales que podrían ser estudiadas, en este trabajo se optó por evaluar los aislados bacterianos, bajo condiciones de laboratorio, considerando su potencial antagónico. Primero se evaluó la carga microbiana de bacterias cultivables en los 4 sitios utilizando dos medios de cultivo, uno copiotrófico (LB) y el otro oligotrófico (R2A), permitiendo

rescatar bacterias que provenían de suelos con alta y baja disponibilidad de nutrientes, respectivamente. Se observó que las comunidades de ambos tipos de ambientes en el Parque Nacional Fray Jorge (FJM y FJB) y la matriz del Cerro Santa Inés (SIM) poseen una carga microbiana similar en ambos medios nutritivos. En estudios previos en los que se analizaron bacterias obtenidas de suelos semiáridos, se alcanzaron valores de  $10^6$ - $10^7$  UFC/g suelo (e.g. Gorlach-Lira y Coutinho, 2007), mientras que en suelos fértiles con un pH 5,9 se determinó que la carga microbiana alcanzó las  $10^7$  UFC/g suelo (O'Neill y col., 2009); valores en promedio cercanos a los que se obtuvieron en este estudio. Por su parte, en el suelo obtenido del bosque del Cerro Santa Inés (SIB) se determinó una carga microbiana significativamente mayor en ambos medios de cultivo, lo que podría deberse al mayor contenido de nitrógeno que se detectó en este sitio con respecto a los otros tres; ya que se ha descrito que comunidades bacterianas responden significativamente modificando la abundancia de ciertos grupos (Nemergut y col., 2008; Ramírez y col., 2012). Esta mayor cantidad de nitrógeno podría ser de origen antropogénico, ya que el bosque de Santa Inés hasta fines del año 2013 no se encontraba protegido y era de fácil acceso público (Riffo, C., 2014).

Se aislaron en total 265 bacterias, las cuales representaron diferentes morfotipos, y se ensayaron en cuanto a su potencial antagónico mediante la evaluación de 3 actividades: producción de cianuro, de sideróforos y quitinasas. Al ensayar la producción de cianuro se determinó que no existe una condición de suelo que albergue bacterias con mayor producción potencial de dicho compuesto, esto puede deberse a que muchos géneros bacterianos poseen dicha capacidad (Knowles, 1976). Respecto a la liberación de sideróforos, se observó que los bosques presentaron mayor porcentaje de bacterias productoras en relación a las matrices, lo que podría explicarse porque una fuente importante de hierro se encuentra en la materia orgánica,

específicamente en ácidos húmicos, desde donde moléculas de sideróforos son capaces de quelar hierro con mayor estabilidad y especificidad (Barton y Abadía, 2006). Al determinar la capacidad de producción de quitinasas, se observó que un bajo porcentaje de bacterias poseían dicha característica y principalmente provenían desde las matrices. Concordantemente, se ha demostrado que suelos desérticos sometidos a altas temperaturas poseen mayores tasas de degradación de quitina (Manucharova y col., 2011).

En las últimas décadas, el interés por el rol de los microorganismos y la importancia de su interacción con las plantas ha ido en aumento; principalmente porque existen microorganismos que se han destacado por sus importantes aplicaciones en sanidad y estimulación vegetal. Esto último, aparece como una alternativa sustentable y probada que permite reducir el uso de agroquímicos dañinos para la salud y el medio ambiente (Gerhardson, 2002).

Entre los aislados seleccionados en este trabajo se identificaron representantes de los géneros: *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* (filo *Actinobacteria*); *Bacillus*, *Paenibacillus* (filo *Firmicutes*); *Pedobacter* y *Chryseobacterium* (filo *Bacteroidetes*). En la clase *Gamma-proteobacteria* se identificaron principalmente miembros del género *Pseudomonas* y en menor medida de los géneros *Enterobacter*, *Butiauxiella*, *Serratia*, *Rahnella*, *Yersinia* y *Stenotrophomonas*; mientras que en la clase *Beta-proteobacteria*, se identificó el género *Achromobacter*. Todos estos géneros se han asociado en la literatura a la producción de alguna de las propiedades antagónicas de selección mencionadas en este estudio. Tal es el caso de la producción de sideróforos, los que son comúnmente producidos por bacterias del suelo pertenecientes a géneros como *Erwinia*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* (Ahmed, 2013), *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Serratia* (Martinez-Viveros y col., 2010).



Por otro lado, muchos géneros bacterianos han demostrado ser capaces de producir cianuro, entre ellos: *Pseudomonas*, *Chromobacterium* (Knowles, 1976), *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* (Martinez-Viveros y col., 2010) y *Enterobacter* (Ramesh y col., 2014). La producción de este compuesto se encuentra principalmente asociada al género *Pseudomonas*, algunos estudios han demostrado que cerca del 50% de las bacterias pertenecientes a este género aisladas de rizósfera de papa y maíz son capaces de producir cianuro *in vitro* (Bakker y Schippers, 1987; Schippers y col., 1990). Por su parte, la producción de quitinasas se ha asociado a géneros como *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Streptomyces*, *Bacillus* (Cody, 1989), *Stenotrophomonas* (Kamil y col., 2007) y *Paenibacillus* (Pagnoncelli y col., 2010).

Mientras que las metodologías moleculares independientes de cultivo, en particular la clonación y secuenciación del marcador molecular rRNA 16S, proveen información sobre la composición bacteriana de una muestra ambiental sin la necesidad de cultivar las bacterias de dicha comunidad, es esencialmente imposible aprender sobre nuevos genes, vías o funciones a partir de los datos de secuenciación de un marcador molecular particular desde DNA purificado directamente desde la muestra de suelo; por lo que obtener información de la producción de metabolitos naturales y ciertas actividades enzimáticas, requiere la obtención de aislados bacterianos en cultivos de laboratorio (Stewart, 2012). Se ha descrito que no todos los aislados tienen el mismo grado de antagonismo (Mushtaq y col., 2010), y respecto a ello, poco se conoce acerca de la frecuencia y ecología de estas bacterias en determinados suelos, por lo que conocer sobre ello podría ayudar a identificar nuevas variedades que se adapten mejor a suelos específicos (Raaijmakers y col., 2002). Por lo tanto, la colección de bacterias aisladas desde los sitios de estudio, posee un potencial único que debe ser analizado en futuros estudios.

Al realizar análisis multivariados de la composición dependiente de cultivo (colonias), se observa que los 4 sitios se separan tanto por regiones como por hábitats, sugiriendo que, a nivel de las funciones antagónicas medidas, cada comunidad posee propiedades únicas que dependen de la influencia tanto del ambiente como de la geografía. Por otro lado, cuando los mismos análisis se realizaron sobre la composición independiente de cultivo (clones), las comunidades de bosques son más similares entre sí, y se separan claramente de las matrices. Esto sugiere que si no se aplica una selección por alguna característica determinada, las comunidades se comportan respondiendo principalmente al hábitat, con cierta influencia de las variables geográficas.

En un análisis de comparación de la composición a nivel de filo, las librerías génicas son capaces de rescatar la diversidad general de los suelos, mientras que la metodología dependiente de cultivo no permitió detectar la presencia de nuevos filos. Sin embargo, a nivel de OPU, cada una de las metodologías aplicadas presentó patrones de distribución localizados y exclusivos para cada sitio, siendo pocos los grupos compartidos entre sí. Del total de 226 OPUs definidos en el árbol filogenético, sólo 2 OPUs fueron comunes entre ambas metodologías. Por lo tanto, 205 OPUs fueron exclusivos de las librerías génicas y 19 grupos fueron exclusivos de la metodología dependiente de cultivo. Esta observación coincide con la de Donachie y col. (2007), quienes mediante una recopilación de trabajos que incluyeron análisis de la diversidad detectable mediante herramientas dependientes e independientes de cultivo en diferentes hábitats, concluyen que una parte importante de la diversidad es recuperada por cada una de las técnicas por sí solas, y que solo un porcentaje menor de la diversidad es detectada por ambas aproximaciones.

Asimismo, es posible observar que hay un número reducido de OPU's comunes entre sitios, principalmente por que la identificación taxonómica llevada a cabo en este trabajo consideró relaciones filogenéticas con secuencias desde bases de datos secundarias y terciarias, las cuales permiten obtener un mayor nivel de resolución en el análisis de identificación de cada secuencia. Hanson y col. (2012) comentan la importancia del grado de resolución con el que se comparan las comunidades, proponiendo que si, por ejemplo, se analizan secuencias de localidades separadas geográficamente con un 99% de identidad respecto a las de las bases de datos, se observará claramente la existencia de taxones endémicos; mientras que si los taxones se definen al 97% de identidad, será mas difícil evaluar endemismo.

Finalmente, se analizaron el total de OPU's rescatadas por ambas metodologías para evaluar el efecto de las variables edáficas y geográficas sobre la distribución de OPU's en las comunidades, observándose que una fuerte influencia es explicada por factores ambientales actuales (81,3%) y que la influencia geográfica también hace un aporte importante a la distribución (55,2%).

#### **4.3. Diversidad de las comunidades bacterianas edáficas: estructura genética y metabólica**

El análisis de la estructura de la comunidad mediante TRFLP del gen del rRNA 16S, como todas las metodologías presenta limitaciones, revelando principalmente a las especies más abundantes y entregando así parcialmente información sobre la riqueza total (Forney, 2004). Por lo tanto, la ausencia de un TRF no confirma la ausencia de una especie (Dickie y col. 2002); más aun, la presencia tampoco asegura la existencia de una especie, ya que se ha demostrado la presencia de pseudo-TRFs

(Egert y Friedrich, 2003). Por otro lado, el proceso de estandarización de los datos elimina aquellas señales que se encuentran por debajo de cierto valor de fluorescencia, dejando solo aquellos TRF que se encuentran altamente representados, lo que podría conducir a eliminar TRFs reales que se encuentran poco representados en la muestra, por encontrarse en el límite de discriminación del método (Dunbar y col., 1999). Se ha descrito también, que secuencias estrechamente relacionadas presentan diferentes tamaños de TRF y que secuencias de diferentes filos produjeron tamaños de TRF similares (Hartmann y Widmer, 2006). Sin embargo, a pesar de las limitaciones mencionadas que podrían homogenizar los resultados, el TRFLP es una técnica muy poderosa y reproducible en particular para la comparación entre muestras sometidas a distintos tratamientos (Liu y col., 1997; Marsh, 1999; Hartmann y Widmer, 2006). En el presente trabajo, los TRFs detectados son los mismos en las diferentes comunidades, por lo que las comunidades no presentan diferencias en riqueza, aunque sí presentan diferencias en abundancia, con características únicas para cada sitio.

En el análisis multivariado de la estructura genética de las comunidades, éstas se separan principalmente por hábitat, apareciendo llamativamente las matrices más cercanas entre sí que los bosques. Aún cuando solo se registró la estructura basada en los grupos dominantes, se observaron 2 grupos bien definidos.

Cuando se realizó el análisis de la composición a nivel de filo, de los 12 identificados por clones, 5 de ellos se encontraron compartidos en las 4 comunidades, lo que representaron entre el 50% y el 80% de la abundancia relativa total (Figura 10-lzquierda), grupos dominantes que podrían explicar la homogeneidad de los TRFs observados en el análisis de la estructura genética de la comunidad.

Sin embargo, las comunidades descritas mediante metodologías basadas en DNA podrían estar inactivas; se ha descrito que, en promedio, el 90% de las bacterias del



suelo están metabólicamente inactivas, lo que podría tener importantes efectos en procesos ecológicos, sucesionales y de recuperación de la comunidad a eventos de perturbación (Fierer y Lennon, 2011). Por lo tanto, mediante el análisis de CLPP se demostró que las comunidades están metabólicamente activas y que cada una presenta características particulares. Las comunidades bacterianas en ambos bosques presentaron una cinética de metabolización de las fuentes de carbono similar, y diferente a la observada en las matrices aledañas, teniendo estas últimas, a su vez, características únicas. Las comunidades del bosque de ambas localidades presentaron mayor actividad total, una rápida respuesta al uso de fuentes de carbono disponibles, y capacidad de metabolizar un mayor número de tipos de estructuras químicas comparado con las matrices. Aunque los resultados obtenidos no concuerdan totalmente con los observados por Guevara (2007) desde muestras de suelo del Parque Nacional Fray Jorge; se ha reportado que la estructura metabólica de la comunidad microbiana depende de la disponibilidad y calidad de la materia orgánica y el estado nutricional del suelo (Bossio y col., 1998; Øvreås y Torsvik, 1998; Griffiths y col., 1999).

En el análisis multivariado de la estructura metabólica de las comunidades, éstas se separan principalmente por hábitat, donde los bosques son más similares entre sí que con las matrices. Aún cuando solo se registró la estructura basada en los grupos activos, se observaron 2 grupos bien definidos. Los bosques, muestran mayor similitud entre réplicas que las matrices, generando grupos discretos más compactos, sugiriendo que dicho efecto podría deberse a la cercanía histórica que los relaciona (Pérez, 1994; François, 2004; Villagrán y col., 2004) y al aporte constante de determinadas fuentes de carbono, a diferencia de las matrices que poseen un aporte menos constante de éstas. Sumado a ello, en el análisis de partición de la varianza se

observa que la mayor influencia es explicada por factores ambientales (62,2%) más que por factores geográficos (17,6%).

Es importante mencionar que las fuentes de carbono que se ensayan en este método no reflejan necesariamente los sustratos presentes en el medio ambiente desde el que provienen los microorganismos, por lo que algunas especies serán incapaces de crecer en las placas debido a la falta de los sustratos necesarios (Glimm y col., 1997). Sumado a ello, no todas las bacterias son capaces de metabolizar el indicador de tetrazolium (Winding y col., 1994), por lo que esta metodología permite evaluar el potencial de la fracción de la comunidad que es capaz de metabolizar y crecer en las condiciones entregadas por la placa (Schutter y Dick, 2001). Además, los CLPP son un método de detección de factores que generan cambios en las comunidades, pero no necesariamente pueden ser relacionado con filotipos específicos o grupos funcionales (Garland, 1999).

En general, los resultados obtenidos mediante las técnicas de TRFLP y CLPP presentaron patrones de ordenamiento que distinguen claramente los hábitats. Es importante recordar que las diferencias encontradas entre cada metodología se deben a que la diversidad genética asociada al marcador rRNA 16S no necesariamente se traduce en características metabólicas (fenotípicas). Al respecto, Orlando y col. (2007) sugieren que diferencias en la composición filogenética de las comunidades no impiden que la comunidad posea similares capacidades fisiológicas para metabolizar las fuentes de carbono disponibles en las ecoplacas (Biolog<sup>®</sup>), principalmente porque ciertas taxas microbianas son capaces de modificar el metabolismo como una estrategia adaptativa en ambientes fluctuantes (Fierer y Lennon, 2011).

#### **4.4. Diversidad bacteriana e influencia geoambiental**

Al analizar en conjunto todos los datos obtenidos para las 4 comunidades en cuanto a composición y estructura, es decir, la diversidad, se observó que el ambiente explica un 67,4% de la varianza, mientras que la influencia geográfica alcanza un 10,3%. Por lo tanto, la mayor parte de la variación es explicada por variables ambientales, con menor influencia de las variables geográficas. Sin embargo, un 22,8% de la variación de la comunidad no se explica por las variables explicativas analizadas.

Sumado a ello y considerando los resultados obtenidos con las distintas metodologías, se observa además, que las comunidades bacterianas presentes en los suelos analizados no se distribuyen al azar sino que responden a diversos factores bióticos, abióticos, genéticos y fenotípicos que definen comunidades microbianas con estructuras y composiciones particulares asociadas a los bosques y matrices de los bosques de olivillo de la cordillera de la costa. Varios trabajos apoyan la hipótesis, planteada en este trabajo, de que la distribución de las comunidades está modulada por factores ambientales contemporáneos e históricos. Varios estudios muestran evidencia de que microorganismos de vida libre varían en abundancia, distribución y diversidad, sobre varias escalas taxonómicas y espaciales, considerando rangos que van desde los 2 m a los 20.000 km (Martiny y col., 2006). A modo de ejemplo, se han observado cambios en la estructura y la composición en las comunidades bacterianas a lo largo de un gradiente altitudinal en el desierto de Atacama, difiriendo las comunidades en los sitios más áridos y sin cobertura vegetal de aquellas presentes en sitios con menor aridez y con presencia de cobertura vegetal (Drees y col., 2006). A mayor escala existe evidencia muy similar, al comparar la diversidad microbiana en un gradiente de precipitaciones y cobertura vegetal, se observó que los grupos de

bacterias y arqueas fueron únicos para cada región climática en Israel: árida, semiárida y mediterránea (Angel y col., 2010). En Chile, se llevó a cabo un estudio en los suelos de los relictos chilenos presentes en el Parque Nacional Fray Jorge e Isla Guafo en Chiloé, observándose que las comunidades bacterianas de los bosques se agrupaban con alta similitud pero cada uno con características propias, a su vez diferenciándose de los suelos áridos aledaños, sugiriéndose que las bacterias del suelo no se distribuyen al azar sino que responden a factores bióticos y abióticos que definen comunidades microbianas con una estructura y una composición particular de cada localidad o unidad biogeográfica reconocida (Guevara, 2007). Tanto este último estudio como el realizado en el presente trabajo, apoyan la idea de que la biogeografía de los microorganismos puede ser explicada utilizando los mismos principios que los de los macroorganismos, pero siempre que se consideren las diferencias de escalas entre unos y otros (Fierer y Lennon, 2011; Martiny y col., 2006).

Si consideramos las características de los sitios muestreados, los bosques del Parque Nacional Fray Jorge y del Cerro Santa Inés corresponden a una misma unidad geográfica, que de acuerdo con los estudios geológicos y paleoclimáticos, producto del aumento de la desertificación durante el Holoceno, fueron desestructurados en parches, dejando estos ecosistemas como verdaderos fósiles vivientes (Villagrán y col., 2004) rodeados de matorral. A nivel metabólico y de OPU compartidas, los bosques fueron más similares entre sí, probablemente porque mantienen condiciones históricas, edafo-climáticas y de composición florística más similares que las matrices.

En el presente estudio se observó que existe una fuerte influencia en la distribución bacteriana tanto de factores asociados al tipo de hábitat (bosque o matriz) como a las regiones de muestreo (Parque Nacional Fray Jorge o Cerro Santa Inés). El análisis de las comunidades bacterianas en estudio mostró que la diversidad no está



distribuida al azar sino que, por el contrario, presenta características únicas que permiten distinguir principalmente entre las características de los hábitats (variables edáficas) pero también permite determinar el efecto generado por la procedencia de las comunidades (variables geográficas).

Frente a ello, algunos autores han propuesto que los grupos microbianos se correlacionan con la heterogeneidad espacial, sugiriendo que existiría un filtro medioambiental. Además, estos grupos estarían también condicionados por las características históricas de los sitios de estudio, desempeñando éstas un papel importante en la determinación de los patrones de riqueza de las especies microbianas (Fierer y Lennon, 2011). Esta influencia compartida entre las condiciones actuales e históricas se refleja también en una recopilación de 54 estudios donde se determinó evidencia de los efectos de la selección contemporánea y de los procesos históricos, indicando que la mayoría de los estudios (92,6%) tuvieron una correlación significativa entre la composición microbiana y al menos un parámetro ambiental o de hábitat, lo que demuestra que la selección impuesta por el entorno contemporáneo tiene un papel destacado en la formación de patrones biogeográficos microbianos. Sólo 4 de los 54 estudios revisados (7,4%), no mostró ninguna correlación entre la composición y variables ambientales. Por su parte, una gran proporción de los estudios (68%) también informó de un efecto significativo de la distancia, proporcionando evidencia de que los procesos históricos, incluyendo limitación de la dispersión, influyen en la composición microbiana. Coincidentemente con los resultados del presente trabajo, entre los estudios examinados por Hanson y col. (2012), la selección contemporánea tuvo mayor efecto en la composición microbiana que los procesos históricos.

## 5. Conclusiones

La diversidad de las comunidades bacterianas edáficas presentes en los bosques relictos de Olivillo y en las matrices semiáridas aledañas del Parque Nacional Fray Jorge y del Cerro Santa Inés, dos regiones geográficas separadas por 200 km, presentan características únicas a nivel de composición y estructura. Aunque gran parte de dicha diversidad está influenciada por las condiciones edáficas actuales, también existe un componente histórico, determinado por la localización geográfica de los sitios, que la modela. Consecuentemente, tanto los factores actuales como los eventos pasados, debido a la conexión histórica de los bosques, modelan la diversidad genética y funcional de las comunidades bacterianas edáficas en estos suelos.

## 6. Bibliografía

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res*, 163(2), 173-181
- Ahmed, E. (2013). The interaction between microbes, siderophores and minerals in podzol soil (<http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:617144/FULLTEXT01.pdf>). Department of Geological Sciences, Stockholm University, Stockholm, Sweden.
- American Society for Microbiology. (1994). Bacterial diversity research priorities. *Washington DC. American Society for Microbiology*.
- Amman, R., Ludwig, W., Schleifer, K. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59, 143-169.
- Angel, R., Soares, M., Ungar, E., Gillor, O. (2010). Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. *ISME J*, 4(4), 553-563.
- Arroyo, M., Marquet, P., Marticorena, C., Simonetti, J., Caviares, L., Squeo, F., Rozzi, R., Massardo, F. (2008). El hotspot chileno, prioridad mundial para la conservación. *En: Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos*. Comisión Nacional de Medio Ambiente. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. 2ª Edición. Ocho libros editores Ltda, Santiago. pp. 90-93.
- Avrahami, S., Conrad, R., Braker, G. (2002). Effect of soil ammonium concentration on N<sub>2</sub>O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Appl Environ Microbiol*, 68(11), 5685-5692.
- Baas-Becking, L. (1934). Geobiologie, of Inleiding Tot de Milieukunde: Met Literatuurlijst en Ind (Vol. 18-19, p. 263). En Van Stockum.
- Barton, L., Abadía, J. (2006). Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms (*Google eBook*) (Vol. XVIII.). Springer Science & Business Media, The Netherlands. p. 495.
- Bakker, A., Schippers, B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. *Soil Biol Biochem*, 19(4), 249-256.
- Bodellier, P.; Gillisen, M. J. B.; Hordijk, K.; Sinnighe Damsté, J. S. S.; Rijkstra, W. I. C.; Geenevasen, J. A. J.; Dunfield, P. (2013). Microbial minorities modulate methane consumption through niche partitioning. *The ISME Journal*, 7, 2214-2228.
- Borcard, D., F. Gillet & P. Legendre. (2011). Numerical Ecology with R. Springer, New York, p. 302.
- Bossio D.A., Scow, K.M. (1998). Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb Ecol*, 35, 265-278.
- Bowman, J.P., McCuaig, R.D. (2003). Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microbiol*, 69, 2463-2483
- Burke, A. (2003). How special are Etendeka mesas? Flora and elevation gradients in an arid landscape in north-west Namibia. *J Arid Environ*, 55(4), 747-764.
- Bustamante, M., Verdejo, V., Zuñiga, C., Espinosa, F., Orlando, J., Carú, M. (2012). Comparison of water availability effect on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in microcosms of a Chilean semiarid soil. *Front Microbiol*, 3, 282.
- Campbell, R., Greaves, M. (1990). Anatomy and community structure of the rhizosphere. *En: The rhizosphere*. John Wiley and Sons, New York. pp. 11-34.
- Canty, A., Ripley, B. (2015). boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. R package version 1.3-16.

- Casteleyn, G., Lellaert, F., Backeljau, T., Debeer, A.E., Kotaki, Y., Rhodes, L., Lundholm, N., Sabbe, K., Vyverman, W. (2010). Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 12952-12957.
- Cavieres, L.A., Peñaloza, A., Arroyo, M.T.K. (2000). Altitudinal vegetation belts in the high Andes of central Chile (33°S). *Rev Chil Hist Nat*, 73, 331-344.
- Cho, J., Tiedje, J. (2000). Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl Environ Microbiol*, 66: 5448-5456.
- Cody, R. (1989). Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. *Curr Microbiol*, 19(4), 201-205.
- CONAMA. (2008). Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos. Comisión Nacional de Medio Ambiente. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. 2° Edición. Ocho libros editores Ltda, Santiago.
- Daniel, R. (2004). The soil metagenome a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr Opin Biotechnol*, 15(3), 199-204.
- D'Ambrosio, L., Ziervogel, K., Macgregor, B., Teske, A., and Arnosti, C. (2014). Composition and enzymatic function of particle-associated and free-living bacteria: a coastal/offshore comparison. *ISME J*, 8, 2167-2179.
- Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T. (2002). Vertical distribution of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytol*, 156, 527-535.
- Dinerstein, E., Olson, D., Graham, D., Webster, A., Primm, S., Bookbinder, M., Ledec, G. (1995). A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean. World Bank e-library, University of California, California.
- Donachie, S.P., Hou, S., Lee, K.S., Riley, C.W., Pikina, A., Bellsie, C., Kempe, S., Gregory, T.S., Bossuyt, A., Boerema, J., Liu, J., Freitas, T.A., Malahoff, A., Alam, M. (2004). The Hawaiian Archipelago: a microbial diversity hotspot. *Microb Ecol*, 48(4), 509-520.
- Donachie, S., Foster, J., Brown, M. (2007). Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME J*, 1, 97-99.
- Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., Perez-Galdona, R. (2004). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. *Plant Soil*, 266, 261-272.
- Dray, S., Legendre, P., Blanchet, G. (2013). packfor: Forward Selection with permutation (Canoco p.46). R package version 0.0-8/r109. <http://R-Forge.R-project.org/projects/sedar/>
- Drees, K.P., Neilson, J.W., Betancourt, J.L., Quade, J., Henderson, D.A., Pryor, B.M., Maier, R.M. (2006). Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama desert, Chile. *Appl Environ Microbiol*, 72, 7902-7908.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., Kuske, C.R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol*, 65, 1662-1669.
- Dunbar, J., Ticknor, L., Kuske, C. (2001). Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 67(1), 190-197.
- Edenborn, S.L., Sexstone, A.J. (2007). DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses. *Soil Biol Biochem*, 39(7), 1570-1579.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of

chimera detection. *Bioinformatic*, 27(16), 2194-2200.

Egert, M., Friedrich, M.W. (2003). Formation of pseudoterminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol*, 69, 2555-2562.

Faoro, H., Alves, A., Souza, E., Rigo, L., Cruz, L., Al-janabi S., Monteiro, R., Baura, V.A., Pedrosa, F.O. (2010). Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic forest. *Appl Environ Microbiol*, 76(4), 4744-4749.

Fernández, I.E. (2004). Caracterización química de los suelos del Bosque de Fray Jorge. En: *Historia Natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge*. F.A. Squeo, J.R. Gutiérrez & I.R. Hernández, (editores). Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. pp. 265-279.

Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., Akkermans, A. (1998). Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). *Appl Environ Microbiol*, 64, 871-879.

Fierer, N., Jackson, R.B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS*, 103(3), 626-631.

Fierer, N. (2008). Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. En: *Accessing uncultivated microorganisms: from the environment to organisms and genomes and back*. K. Zengler, (editor). ASM Press, Washington DC. p. 95-115.

Fierer, N., Lennon, J. (2011). The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *Am J Bot*, 98(3), 439-448.

Foley, M., Sigler, V., Gruden, C. (2008). A multiphasic characterization of the impact of the herbicide acetochlor on freshwater bacterial communities. *The ISME Journal*, 2, 56-66

Forney, L.J., Zhou, X., Brown, C.J. (2004). Molecular microbial ecology: land of the one eyed king. *Curr Opin Microbiol*, 7: 210-220.

Francois, JP. (2004). Eslabones de una cadena rota: el caso del bosque relicto de Santa Inés. La Serena. En: *Historia Natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge*. F.A. Squeo, J.R. Gutiérrez & I.R. Hernández, (editores). Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. p. 4-60.

Fravel, D.R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu Rev Phytopathol*, 28, 75-91.

Fulthorpe, R., Rhodes, A., Tiedje, J. (1998). High levels of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 64, 1620-1627.

Gajardo, R. (1994). La vegetación natural de Chile. Clasificación y distribución geográfica. Editorial Universitaria. Santiago, Chile.

Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L., Muyzer, G. (1996). Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl Environ Microbiol*, 62, 3284-3291.

Garland, J.L., Mills, A.L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol*, 57(8):2351-2359.

Garland, J. (1997). Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 24(4), 289-300.

Garland, J. (1999). Potential and limitations of BIOLOG for microbial community analysis. *Methods of*

*Microbial Community Analysis. Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.* C.R. Bell, M. Brylinsky, P. Johnson-Green (editores).

**Gerhardson, B. (2002).** Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol*, 20, 338-343.

**Glimm, E., Heuer, H., Engeleen, B., Smalla, K., Backhaus, H. (1997).** Statistical comparisons of community catabolic profiles. *J Microbiol Methods*, 30(1), 71-80.

**Good, J.I. (1953).** The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 40(3/4), 237-264.

**Gorlach-Lira, K., Coutinho, H. (2007).** Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. *Braz J Microbiol*, 38(1).

**Guevara, R. (2007).** Diversidad genética y funcional de grupos bacterianos en suelos con diferente tipo de cobertura vegetal: efectos biogeográficos y perturbación humana. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. Tesis Doctoral.

**Green, J.L., Holmes, A.J., Westoby, M., Oliver, I., Briscoe, D., Dangerfield, M., Gillings, M., Beattie, A.J. (2004).** Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature*, 432, 747-750.

**Greze, A., Simonetti, J., Bustamante, R. (2007).** Biodiversidad en ambientes fragmentados de Chile: patrones y procesos a diferentes escalas. *Cienc Investig Agrar*, 34, 159-159.

**Griffiths, B., Ritz, K., Ebbelwhite, N., Dobson, G. (1999).** Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem*, 31, 145-153.

**Hammer, Ø., Harper, D.A., Ryan, P.D. (2001).** PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*, 4(1), 1-9.

**Hanson, C.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., Martiny, J.B.H. (2012).** Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nat Rev Microbiol*, 10, 497-506.

**Hartmann, M., Widmer, F. (2006).** Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Appl Environ Microbiol*, 72(12), 7804-7812.

**Hawksworth, D. (1991).** The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture. CAB International. Wallingford. p. 302.

**Holland, S. (2003).** Analytic rarefaction 1.3. UGA Stratigraphy Lab. (<http://strata.uga.edu/software/anRareReadme.html>).

**Horner-Devine, M. C., Lage, M., Hughes, J. B., Bohannan, B. J. M. (2004).** A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432, 750-753

**Hovatter, S.R., DeJelo, C., Case A.L., Blackwood, C.B. (2011).** Metacommunity organization of soil microorganisms depends on habitat defined by presence of *Lobelia siphilitica* plants. *Ecology*, 92, 57-65

**Insam, H., Goberna, M. (2004).** Use of Biolog for the Community Level Physiological Profiling (CLPP) of environmental samples. *Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition*, 4(1), 853-860.

**Jain, R., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P., Bhattacharya, D., Thakur, I. (2005).** Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Current Sci*, 89(1), 101-112.

**Janssen, P.H. (2006).** Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 72(3), 1719-1728.

**Kaiser, O., Puhler, A., Selbitschka, W. (2001).** Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizosphere of oilseed rape (*Brassica napus* cv. Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-

independent approaches, *Microb Ecol*, 42(2), 136-149.

Kamil, Z., Rizk, M., Saleh, M., Moustafa, S. (2007). Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Glob J Multidiscip Stud*, 2(2), 57-66.

Kannapiran, E., Ramkumar, V. (2011). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the sediments of Thondi coast, Palk Strait, Southeast coast of India. *Ann Biol Res*, 2(5), 157-163 .

Kennedy, A. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ*, 74(1-3), 65-76.

Kirk, J., Beaudette, L., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J., Lee, H., Trevors, J. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Meth.*, 58(2):169-188.

Knowles, C. (1976). Microorganisms and cyanide. *Bacteriol Rev*, 40(3), 652-680.

Kuddus, S., Ahmad, R. (2013). Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *J Genet Eng Biotechnol*, 11(1), 39-46.

Legendre, P. Legendre, L. (1998). Numerical Ecology. Elsevier. Amsterdam.

Lepš, J., Smilauer, P. (2003). Multivariate analysis of ecological data using CANOCO. Cambridge University Press. Cambridge.

Lin, Y.T., Huang, Y.J., Tang, S.L., Whitman, W., Coleman, D., Chiu, C.Y. (2010). Bacterial community diversity in undisturbed perhumid montane forest soils in Taiwan. *Microbial Ecol*, 59(2), 369-78.

Liu, W., Marsh, T., Cheng, H., Forney, L. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 63(11), 4516-4522.

Louden, B., Haarmann, D., Lynne, A. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *J Microbiol Biol Educ*, 12(1), 51-53.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Y., Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res*, 32(4), 1363-1371.

Manucharova, N., Vlasenko, A., Men'ko, E., Zvyagintsev, D. (2011). Specificity of the chitinolytic microbial complex of soils incubated at different temperatures. *Microbiology*, 80(2), 205-215.

Martinez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., & Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J Soil Sci Plant Nutr*, 10(3), 293-319.

Martiny J. B. H., Bohannan, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Ovreås, L., Reysenbach, A.L., Smith, V.H., Staley, J.T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol* 4(2), 102-112.

Marsh, T.L. (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol* 2, 323-327.

McAllister, M., Davis, R., McBeth, J., Tebo, B., Emerson, D., Moyer, C. (2011). Biodiversity and emerging biogeography of the neutrophilic iron-oxidizing Zetaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 77(15), 5445-5457.

Minasny, B., McBratney, A.B., Brough, D.M., Jacquier, D. (2011). Models relating soil pH measurements in water and calcium chloride that incorporate electrolyte concentration. *Eur J Soil Sci*, 62 (2), 1365-2389

Murthy, N., Bleakley, B. (2012). Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase producing microorganisms. *Internet J Microbiol*, 10(2).

Mushtaq, S., Ali, A., Khokhar, I., Mukhtar, I. (2010). Antagonistic potential of soil bacteria against foodborne fungi. *World Appl Sci J*, 11(8), 966-969.

Muyzer, G., de Waal, E., Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59(3), 695-700.

Nautiyal, C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 170(1), 265-270.

Nemergut, D.R., Townsend, A.R., Sattin, S.R., Freeman, K.R., Fierer, N., Neff, J.C., Bowman, W.D., Schadt, C.W., Weintraub, M.N. (2008). The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling. *Environ Microbiol*, 10(11), 3093-3105.

Nold, S., Pangborn, J., Zajack, H., Kendall, S., Rediske, R., Biddanda, B. (2010). Benthic bacterial diversity in submerged sinkhole ecosystems. *Appl Environ Microbiol*, 76(1), 347-351.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Wagner, H. (2015). Vegan: community ecology package. R package version 2.2-1. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

O'Neill, B., Grossman, J., Tsai, M., Gomes, J., Lehmann, J., Peterson, J., Neves, E., Thies, J.E. (2009). Bacterial community composition in Brazilian anthroposols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. *Microb Ecol*, 58(1), 23-35.

Orlando, J., Chavez, M., Bravo, L., Guevara, R. (2007). Effect of *Colletia hystrix* (Clos), a pioneer actinorhizal plant from the Chilean matorral, on the genetic and potential metabolic diversity of the soil bacterial community. *Soil Biol Biochem*, 39(11), 2769-2776.

Orlando, J., Carú, M., Pommerenke, B., Braker, G. (2012). Diversity and activity of denitrifiers of Chilean arid soil ecosystems. *Front Microbiol*, 3, 101.

Øvreås, L., Torsvik, V. (1998). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb Ecol* 36, 303-315.

Pagaling, E., Wang, H., Venables, M., Wallace, A., Grant, W., Cowan, D., Jones, J., Ma, Y., Ventosa, A., Heaphy, S. (2009). Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina. *Appl Environ Microbiol*, 75(18), 5750-5760.

Pagnoncelli, M., De Araujo, N., Da Silva, N., De Assis, C., Rodrigues, S., De Macedo, G. (2010). Chitinase production by *Paenibacillus ehimensis* and its application for chitosan hydrolysis. *Braz Arch Biol Technol* 53(6), 1461-1468.

Pedro-Alió, C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol*, 14(6), 257-263.

Pérez, C. (1994). Índices de esclerofilia en relación a la calidad química de la hojarasca y el grado de mineralización potencial del nitrógeno del suelo superficial del bosque de "olivillo" (*Aextoxicon punctatum* R. et Pav). *Rev Chil Hist Nat*, 67, 101-109.

Pérez, C., Villagran, C. (1994). Influencia del clima en el cambio florístico, vegetacional y edáfico de los bosques de "olivillo" (*Aextoxicon punctatum* R. et Pav.) de la Cordillera de la Costa de Chile: implicancias biogeográficas. *Rev Chil Hist Nat*, 67, 77-90.



- Peres-Neto, P., Legendre, P., Dray, S. and Borcard, D., (2006). Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology*, 87, 2614-2625.
- Pontes, D., Lima-Bittencourt, C., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. (2007). Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *J Ind Microbiol Biot*, 34(7), 463-473
- Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K.H., Simu, K., Lundberg, P., Tunlid, A., Hagström, A. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol Ecol*, 16, 867-880.
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S., Treusch, A., Jurgens, E., Scheleper, C. (2003). *Acidobacteria* form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molec Microbiol*, 50(2), 563-575.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Raaijmakers, J., Vlam, M., de Souza, T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *A van Leeuw*, 81, 537-547.
- Ramesh, A., Sharma, S., Sharma, M., Yadav, N., Joshi, O. (2014). Plant growth-promoting traits in *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* MDSR9 isolated from soybean rhizosphere and its impact on growth and nutrition of soybean and wheat upon inoculation. *Agr Res*, 3(1), 53-66.
- Ramírez K., Craine J.M., Fierer N. (2012). Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biol*, 18(6), 1918-1927.
- Reyes, F., Lillo, A., Ojeda, N., Reyes, M., Alvear, M. (2011). Efecto de la exposición y la toposecuencia sobre actividades biológicas del suelo en bosque relicto del centro-sur de Chile. *Bosque (Valdivia)*, 32(3), 255-265.
- Riffo, C. (2014). Cerro Santa Inés: un tesoro por descubrir. Mayo 17, 2015. Diario El Día. <http://diarioeldia.cl/articulo/region/cerro-santa-ines-un-tesoro-descubrir>
- Sadzawka, A., M. Carrasco, R. Grez, M.L. Mora, H. Flores, y A. Neaman. (2006). Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Serie Actas INIA N° 34. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.
- Sait, M., Davis, K., Janssen, P. (2006). Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl Environ Microbiol*, 72(3), 1852-1857.
- Schippers, B., Bakker, A., Bakker, P., Van Peer, R. (1990). Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant Soil*, 129, 75-83.
- Schloss, PD, Westcott, SL, Ryabin, T. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75(23), 7537-7541.
- Schutter, M., Dick, R. (2001). Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biol Biochem*, 33, 1481.
- Shaffer, B., Widmer, F., Porteous, L., Seidler, R. (2000). Temporal and spatial distribution of the *nifH* gene of N<sub>2</sub> fixing bacteria in forests and clearcuts in western Oregon. *Microb Ecol*, 39(1), 12-21.
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Tebbe, C. (2007). Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *J Microbiol Meths*, 69, 470-479.

Squeo, F.A., Arroyo, M.T.K. (2001). Presentación científica del Libro Rojo de la Flora Nativa y de los sitios prioritarios para su conservación: Región de Coquimbo. En: *Libro rojo de la flora nativa y de los sitios prioritarios para su conservación: Región de Coquimbo*. F.A. Squeo, G. Arancio & J.R. Gutiérrez, (editores). Ediciones Universidad de La Serena, La Serena. pp. 3-11.

Steubing, L., Godoy, R., Alberdi, M. (2002). *Métodos de Ecología Vegetal*. Primera Edición. Editorial Universitaria. Chile.

Stewart, E. (2012). Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol*, 194(16), 4151-4160.

Ter Braak C.J.F. (1994). Canonical community ordination. Part I: Basic theory and linear methods. *Ecoscience*, 1, 127-140.

Ter Braak, C.J., Smlauer, P. (1998). CANOCO reference manual and user's guide to CANOCO for Windows. Software for canonical community ordination, version 4. Microcomputer Power, Ithaca, New York, USA.

Verma, V., Joshi, K., Mazumdar, B. (2012). Study of siderophore formation in nodule-forming bacterial species. *Res J Chem Sci*, 2(11), 26-29.

Villagrán, C., Armesto, J., Hinojosa, F., Cuvertino, J., Pérez, C., Medina, C. (2004). El enigmático origen del bosque relicto de Fray Jorge. En: *Historia Natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge*. F.A. Squeo, J.R. Gutiérrez & I.R. Hernández, (editores). Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. pp. 3-43.

Wang, J.G., Bakken, L. R. (1998). Screening of soil bacteria for poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microb Ecol*, 35, 94-101.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173(2), 697-703.

Widmer, F., Shaffer, B., Porteous, L., Seidler, R. (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(2), 374-380.

Winding, A., Binnerup, S., Sorensen, J. (1994). Viability of indigenous soil bacteria assayed by respiratory activity and growth. *Appl Environ Microbiol* 60(8), 2869-2875.

Yeager, C., Kornosky, J., Housman, D., Grote, E., Belnap, J., Kuske, C. (2004). Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Appl Environ Microbiol*, 70(2), 973-983.

Zelles, L., Bai, Q. (1993). Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biol Biochem*, 25(4), 495-507.

Zhang, Y., Li, D., Wang, H., Xiao, Q, Liu, X. (2006). The diversity of denitrifying bacteria in the alpine meadow soil of Sanjiangyuan natural reserve in Tibet Plateau. *Chinese Sci Bulletin*, 51(10), 1245-1254.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Riet, V.K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol*, 56(6), 1875-1881.

## 7. Anexos

Tabla A1. Tabla de los OPUs obtenidos mediante las aproximaciones dependiente e independiente de cultivo.

Grupo	Integrantes (pb)	n	Afilación a secuencia cercana	Número de acceso	% similitud	
Actinobacteria	OPU 1	FJ13RNco (734)	1	<i>Microbacterium aerolatum</i>	AJ309929	> 99,3
	OPU 2	FJ23LXco (925)	1	<i>Microbacterium maritopicum</i>	AJ853910	> 99,9
	OPU 3	SIB44cl(954)	1	<i>Microbacterium immunditarium</i>	DQ119293	> 98,2
	OPU 4	SIM52cl (1041)	1	<i>Leifsonia poae</i>	AF116342	> 97,8
	OPU 5	FJM52cl (992)	1	<i>Amnibacterium kyonggiense</i>	FJ527819	> 95,8
	OPU 6	FJM2cl (1038)	1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AJ312209	> 99,9
	OPU 7	FJM20cl (1057), SI23RHco (663)	2	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	AF102267	> 98,3
	OPU 8	FJM72cl (979)	1	<i>Promicromonospora imudemergens</i>	FN293378	> 98,7
	OPU 9	FJM11cl (1034)	1	<i>Cellulomonas aerilata</i>	EU560979	> 98
	OPU 10	FJM57cl (1058)	1	<i>Nocardioides kribbensis</i>	AY835924	> 96,8
	OPU 11	FJM46cl (993)	1	<i>Nocardioides halotolerans</i>	EF466122	> 98,4
	OPU 12	SIM31cl (880)	1	<i>Nocardioides mesophilus</i>	EF466117	> 97,1
	OPU 13	FJM58cl (1063), SIM44cl (1019)	2	<i>Microclunatus phosphovorius</i>	Z78207	>96,6
	OPU 14	SIM16cl (855)	1	<i>Microclunatus soli</i>	FJ807672	> 96,8
	OPU 15	SI33LD2co (759), FJ23Rlco (653)	2	<i>Streptomyces kunmingensis</i>	DQ442513	> 99,5
	OPU 16	SI13RCOco (759)	1	<i>Streptomyces enissocaesilis</i>	AB249930	> 97,7
	OPU 17	FJM24cl (957)	1	<i>Streptomyces flavovariabilis</i>	EF178691	> 98,7
	OPU 18	FJM89cl (951)	1	<i>Streptomyces marinus</i>	AB473554	> 98,3
	OPU 19	SIM64cl (988)	1	<i>Streptomyces alni</i>	DQ460470	> 98,6
	OPU 20	FJM80cl (900)	1	<i>Streptomyces atacamensis</i>	HE577171	> 94,4
	OPU 21	SIM42cl (1018), SIM71cl (1009)	2	No cultivable <i>Jatrophihabitans - lava</i>	HM445326	> 95,7
	OPU 22	SIM32cl (997)	1	No cultivable <i>Jatrophihabitans - suelo</i>	DQ450794	> 97,5
	OPU 23	FJB39cl (1016), FJB28cl (1005), SIM17cl (883)	3	No cultivable <i>Acidotherrnus - suelo</i>	AB821177	>92,8
	OPU 24	SIM29cl (986)	1	No cultivable <i>Frankineae - suelo</i>	JX133556	> 98,7

OPU 25	SIM22cl (1054) , SIM46cl (891), SIM19cl (901)	3	<i>Jatrophihabitans endophyticus</i> – sp tipo.	JQ346802	> 95,4
OPU 26	FJM14cl (1045)	1	<i>Modestobacter marinus</i>	EU181225	>99,2
OPU 27	FJM18cl (930)	1	<i>Thermomonospora curvata</i> - sp tipo..	D86945	> 91,4
OPU 28	FJM29cl (1053)	.1	<i>Actinomadura scrupuli</i>	FM210339	> 99,3
OPU 29	SIM33cl (1018)	1	<i>Actinoplanes liguriensis</i>	AJ865471	> 97,4
OPU 30	FJB47cl (1021), FJB69cl (1000)	2	<i>Couchioplanes caeruleus</i>	X93202	> 95,8
OPU 31	FJM19cl (1025), FJM41cl (1001), FJM6cl (967)	3	<i>Sciscionella marina</i>	EU503139	> 92
OPU 32	SIM7cl (1050), SIM28cl (994), SIM56cl (1004), SIM10cl (1125)	4	No cultivable <i>Crossiella</i> - Lava	HM445516	> 91,4
OPU 33	SIM3cl (1019), FJM88cl (1000), FJM86cl (980)	3	<i>Iamia majanohamensis</i>	AB360448	> 90,3
OPU 34	FJM61cl (1060)	1	No cultivable <i>Acidomicrobiaceae</i> - Suelo	GQ487899	94,5
OPU 35	SIM2cl (1040)	1	<i>Illuminatobacter fluminis</i> – sp. tipo	AB360343	>92,8
OPU 36	FJB67cl (1015)	1	No cultivable <i>Aciditerrimona</i> - suelo	AB821189	> 97,1
OPU 37	SIM47cl (993)	1	No cultivable <i>Aciditerrimona</i> - suelo	EF516363	> 98,9
OPU 38	SIB67cl (992)	1	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> sp. tipo	AB517669	>89
OPU 39	FJM45cl (1040)	1	No cultivable <i>Aciditerrimona</i> - suelo	EU132523	> 98,8
OPU 40	FJB49cl (934)	1	No cultivable <i>Aciditerrimona</i> - suelo	AM935299	> 97,1
OPU 41	FJM50cl (1059), SIB76cl (1028), FJM79cl (991), FJM40cl (971)	4	<i>Solirubrobacter ginsenosidimitans</i>	EU332825	> 95,1
OPU 42	SIM51cl (1037), SIM68cl (1028), SIM85cl (948), SIM88cl (950), SIM24cl (880), SIM54cl (1016)	6	<i>Conexibacter woesei</i>	CP001854	> 93,6
OPU 43	FJM32cl (1065), FJM23cl (1043), FJM33cl (997)	3	No cultivable <i>Solirubrobacterales</i> 288-2 - suelo	JX079376	> 93,8
OPU 44	FJM70cl (1037)	1	No cultivable <i>Solirubrobacterales</i> 0319-6M6 - suelo	JX079303	> 97,5
OPU 45	FJM54cl (1061), SIB36cl (1040), FJM62cl (760), SIM73cl (949)	4	No cultivable <i>Solirubrobacterales</i> 480-2 - suelo	GU983364	>96,1
OPU 46	FJM65cl (988)	1	No cultivable <i>Solirubrobacterales</i>	HQ120788	>97,7

1332 - suelo						
	OPU 47	FJM13cl (1125)	1	No cultivable <i>Solirubrobacterales</i> 480-2 - suelo	EU677391	>97,5
	OPU 48	FJM59cl (1084), FJB3cl (1054), FJB18cl (901)	3	No cultivable <i>Gaiellales</i> - suelo	EF018825	> 93,8
	OPU 49	SIM40cl (1027), SIB7cl (940)	2	No cultivable <i>Gaiellales</i> - suelo	EF018133	> 96,1
	OPU 50	FJB2cl (1005)	1	<i>Gaiella occulta</i> sp. tipo	JF423906	> 94,8
	OPU 51	SIM14cl (1048)	1	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	U65647	> 94
	OPU 52	FJM42cl (1054), SI13LDco (912), FJ13LBco (583), FJ33LEco (862)	4	<i>Bacillus simplex</i>	AJ439078	> 99,6
<i>Firmicutes</i>	OPU 53	FJM17cl (979)	1	<i>Bacillus fumarioli</i>	AJ250056	> 95,5
	OPU 54	SI65LFco (827), FJ23LUco (588)	2	<i>Paenibacillus lautus</i>	AB073188	> 98,9
	OPU 55	FJ23LEco (603-601)	2	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	EU558281	> 97,5
	OPU 56	SIM62cl (929), FJB84cl (810), SIM63cl (1023), SIM11cl (1134), SIM35cl (1013), SIM59cl (1002)	6	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	AB072735	>88,7
	OPU 57	SIM23cl (1024), SIM61cl (536)	2	No cultivable <i>Gemmatimonas</i> - suelo	AB486649	>95,8
<i>Gemmatimonadetes</i>	OPU 58	SIM72cl (1011)	1	No cultivable <i>Gemmatimonas</i> - suelo	FJ538117	> 98,5
	OPU 59	SIB37cl (1041), SIM79cl (948), FJM3cl (1035), SIM36cl (1012)	4	No cultivable <i>Gemmatimonas</i> - suelo	AF432607	>95,4
	OPU 60	FJM38cl (1034)	1	No cultivable <i>Gemmatimonas</i> - suelo	EU335271	> 97,8
	OPU 61	FJM49cl (983)	1	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	AB072735	> 83,5
	OPU 62	SIM20cl (1027), SIM67cl (908)	2	No cultivable <i>Ktedonobacterales</i> FCPSA73 - suelo	EF516062	> 88,9
	OPU 63	SIM83cl (906)	1	No cultivable <i>Ktedonobacterales</i> 1921-3 - suelo	JX505045	> 96,6
	OPU 64	SIM84cl (965)	1	<i>Ktedonobacter racemifer</i>	AB500145	>88
<i>Chloroflexi</i>	OPU 65	SIM49cl (1003)	1	No cultivable <i>Thermomicrobia</i> - suelo	JX647759	> 90,7
	OPU 66	SIM30cl (1009)	1	No cultivable <i>Thermomicrobia</i> - suelo	JX098780	> 95,2
	OPU 67	FJM55cl (962)	1	No cultivable <i>Chloroflexi</i> TK10 - suelo	EU134263	> 96,4

	OPU 68	FJB79cl (900)	1	No cultivable <i>Chloroflexi</i> TK10 - suelo	JX079347	> 90,7
<i>Armatimonadetes</i>	OPU 69	SIM48cl (1013)	1	<i>Chthonomonas</i> <i>calidirosea</i>	AM749780	> 81,6
	OPU 70	SIM27cl (1035), SIM34cl (991)	2	<i>Methylobacterium</i> <i>iners</i>	EF174497	> 94
	OPU 71	FJM82cl (961), SIM55cl (953)	2	<i>Chelatococcus</i> <i>asaccharovorans</i>	AJ294349	> 93,2
	OPU 72	FJM9cl (993)	1	<i>Microvirga</i> <i>aerilata</i>	CQ421849	>98,1
	OPU 73	SIM45cl (984)	1	No cultivable <i>Methylospora</i>	EU665128	>99,8
	OPU 74	SIM8cl (1090)	1	<i>Rhodoblastus</i> <i>sphagnicola</i>	AM040096	>94,5
	OPU 75	FJB71cl (979)	1	No cultivable <i>Rhizobiales</i> <i>alpha</i> - suelo	DQ906062	>96,4
	OPU 76	SIM74cl (989), SIM6cl (982)	2	No cultivable <i>Rhizobiales</i> 1174- 901-12 - sedimentos	AB128887	> 99
	OPU 77	SIM66cl (706)	1	No cultivable <i>Rhizobiales</i> - suelo	EF018539	> 95,3
	OPU 78	SIB72cl (994), FJM64cl (1011), SIB32cl (886), FJB15cl (1002), FJB36cl (591), FJB40cl (998)	6	No cultivable <i>Pseudolabrys</i>	FJ592559	>97,1
<i>Alfa- proteobacteria</i>	OPU 79	SIB5cl (1020), SIB13cl (1093), SIB26cl (972), FJB48cl (944)	4	<i>Pseudolabrys</i> <i>taiwanensis</i>	DQ062742	> 96,9
	OPU 80	FJB90cl (926), FJB19cl (1026), FJM26cl (1004), SIB51cl (972), FJM36cl (1052)	5	No cultivable <i>Xanthobacteraceae</i> - Deposito Volcánico	FJ466249	>96,4
	OPU 81	SIB21cl (1068)	1	<i>Bradyrhizobium</i> <i>inimotense</i>	AB300992	> 98,8
	OPU 82	SIB53cl (839)	1	<i>Bradyrhizobium</i> <i>lablabi</i>	GU433448	> 96
	OPU 83	FJM31cl (1020)	1	No cultivable <i>Rhizobiales</i> - suelo	JQ798429	> 97,3
	OPU 84	FJB74cl (723)	1	No cultivable <i>Xanthobacteraceae</i>	EF020235	> 95,7
	OPU 85	FJM85cl (970)	1	No cultivable <i>Pseudolabrys</i>	EF020255	> 98,2
	OPU 86	FJB42cl (996)	1	No cultivable <i>Beijerinckiaceae</i>	FJ592558	> 98,9
	OPU 87	SIM77cl (978)	1	<i>Rhizobium</i> <i>galegae</i>	D11343	> 97,4
	OPU 88	FJM43cl (1032), FJM87cl (989)	2	No cultivable <i>Rhizobiales</i> JG34- KF-361 - suelo	JQ769548	> 94,7
	OPU 89	FJB14cl (924), FJB31cl (996)	2	<i>Pedomicrobium</i> <i>manganicum</i>	GU269549	> 95,2

OPU 90	FJM51cl (1009), FJB65cl (919), SIB15cl (1065), FJB17cl (1057), FJB78cl (890), SIB63cl (977)	6	<i>Rhizomicrobium palustre</i>	AB081581	> 89,6
OPU 91	SIM9cl (1114), SIM80cl (978), FJB73CL (949)	3	<i>Rhizomicrobium palustre</i>	AB081581	> 90,7
OPU 92	FJM27cl (1012), SIM89cl (978)	2	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	AJ227780	> 95,6
OPU 93	SIM70cl (1029)	1	<i>Caulobacter segnis</i>	AB023427	> 94,9
OPU 94	SIB85cl (988), FJB34cl (819)	2	<i>Caulobacter segnis</i>	AB023427	> 95,2
OPU 95	FJB70cl (886)	1	<i>Asticcacaulis excentricus</i>	AJ247194	> 96,2
OPU 96	SIB61cl (893)	1	<i>Phenyllobacterium lituiforme</i>	AY534887	> 97,9
OPU 97	FJB5cl (1029), SIB60cl (983)	2	<i>Phenyllobacterium lituiforme</i>	AY534887	> 94,4
OPU 98	SIM76cl (972)	1	<i>Kaistobacter terrae</i>	AB258386	> 97
OPU 99	SIB62cl (984)	1	<i>Novosphingobium lentum</i>	AJ303009	> 97,1
OPU 100	SIM4cl (1063), FJB4cl (1062)	2	<i>Altererythrobacter xinjiangensis</i>	HM028673	> 95,8
OPU 101	FJM83cl (981)	1	<i>Devosia glacialis</i>	HM474794	> 98,1
OPU 102	FJM60cl (1032), FJM10cl (994)	2	<i>Devosia geojensis</i>	EF575560	> 95,9
OPU 103	SIB41cl (974)	1	<i>Caenispirillum bisanense</i>	EF100694	> 90
OPU 104	FJM84cl (941)	1	<i>Skermanella stibiirensistens</i>	HQ315828	> 97,3
OPU 105	FJM15cl (999)	1	<i>Skermanella aerolata</i>	DQ672568	> 99,1
OPU 106	FJB13cl (1007)	1	<i>Elstera litoralis</i>	EU678309	> 91,1
OPU 107	FJB75cl (877), FJB37cl (1068), FJB20cl (699)	3	<i>Dongia mobilis</i>	FJ455532	> 89,1
OPU 108	SIB32cl (1027), SIB82cl (894), FJB72cl (891)	3	<i>Reyranella massiliensis</i>	EF394922	> 95,5
OPU 109	SIM12cl (1068), FJB83cl (801), SIB78cl (1000), FJM56cl (1068), SIM1cl (896), FJB51cl (1011), SIB33cl (909), FJB16cl (822), SIM87cl (986), FJB63cl (1001)	10	No cultivable <i>Rhodospirillales</i> DA111 - suelo	AJ536857	> 91,4
OPU 110	SIM41cl (1036), SIM18cl (1070)	2	<i>Rhodopila globiformis</i>	D86513	> 95,7
OPU 111	SIB19cl (1030), FJM47cl (1000), SIB81cl (892)	3	<i>Acidisphaera rubrifaciens</i>	D86512	> 94,4

	OPU 112	SIB39cl (873)	1	<i>Acidocella aluminiumdurans</i>	AB362219	> 97,3
	OPU 113	SIB17cl (994)	1	No cultivable <i>Rhodospirillales</i> - Deposit volcánico	FJ466268	> 97,5
	OPU 114	FJM5cl (990)	1	<i>Roseomonas aquatica</i>	AM231587	> 97,5
	OPU 115	FJM68cl (1073)	1	No cultivable <i>Rhodospirillales</i> - suelo	JN177899	> 98,4
	OPU 116	FJM37cl (1031)	1	<i>Rhodovibrio sodomensis</i>	FR733704	> 89,1
	OPU 117	SI55RVco (610)	1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	EU391388	> 100
	OPU 118	SI65REco (586)	1	<i>Pseudomonas simiae</i>	AJ936933	> 99,6
	OPU 119	FJ33RAco (1004), SI55RPco (609), FJ33RGco (596)	3	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	AF100323	> 98,8
	OPU 120	FJ63RBCO (624), FJ63LACO (966), SI33LGCO (917), SI33RMCO (970), SI33RHCO (956), SI33RICO (947), SI33RJCO (940), FJ23RHCO (887), FJ45RECO (780), SI33LBCO (742), SI45RACO (738), SI33RLCO (745), SI63LACO (736), SI33RECO (702), SI33RKCO (670), SI55RECO (600), FJ63LHCO (598), SI33RBCO (595), SI23RBCO (596), SI55RDCO (596), SI63RJCO (594), SI55RNCO (589), SI33LDCO (586), SI55RQCO (586), FJ43RJCO (580), SI55LFCO (569), FJ63RFCO (791), FJ65LBCO (592), FJ63LBCO (591), SI55LBCO (926), SI55LACO (593)	31	<i>Pseudomonas jessenii</i>	AF068259	> 98,6
Gamma- proteobacteria	OPU 121	SI43LHCO (591)	1	<i>Enterobacter amnigenus</i>	AB004749	> 98,3
	OPU 122	SI55LKCO (973), SI63LHCO (592), SI43LGCO (594), SI43LNCO (587), SI45LACO (581)	5	<i>Buttiauxiella agrestis</i>	AJ233400	> 98,7
	OPU 123	FJ55LBCO (975), FJ43LHCO (590), SI33LACO (567), FJ53RECO (510)	4	<i>Serratia grimesii</i>	AJ233430	> 98,8
	OPU 124	FJ53LDco (878)	1	<i>Rahnella aquatilis</i>		> 96,7
	OPU 125	FJ43LDCO (598), SI55RBCO (598), FJ43LECO (592)	3	<i>Yersinia ruckeri</i>	AF366385	> 96,2



	OPU 126	FJM90cl (991)	1	<i>Legionella pneumophila</i>	AE017354	> 98,1
	OPU 127	SIM65cl (998)	1	No cultivable <i>Aquicella</i>	HQ118341	> 95,5
	OPU 128	FJB29cl (975)	1	<i>Aquicella siphonis</i>	AY359283	> 92,2
	OPU 129	SI45RKCO (830), SI45RGCO (936), SI65RGCO (850), SI45RICO (852), SI45RBCO (847), SI443RACO (598), SI55RICO (589), SI55LOCO (584), FJ45RCOCO (580)	9	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	AJ294463	> 98,8
	OPU 130	FJB55CL (925), SIB30CL (908), SIB34CL (1023)	3	<i>Rudea cellulositytica</i>	EU741687	> 93,9
	OPU 131	SIB71cl (1016)	1	<i>Dokdonella fugitiva</i>	AJ969432	> 97,2
	OPU 132	FJB80cl (800), SIB29cl (924), FJB66cl (947), SIB52cl (881)	4	<i>Rhodanobacter panaciterrae</i>	EU332829	> 97,7
	OPU 133	FJB10cl (1004)	1	<i>Rhodanobacter denitrificans</i>	FJ851443	> 98
	OPU 134	SIB56cl (1034), SIB55cl (1003)	2	<i>Dyella japonica</i>	AB110498	> 99,3
	OPU 135	FJB43cl (990), FJB61cl (931), FJB25cl (1056)	3	No cultivable <i>Xanthomonadales</i> - suelo	FJ625378	> 96,1
	OPU 136	SIB28cl (1002)	1	No cultivable <i>Xanthomonadales</i> - suelo	FJ466212	> 99,7
	OPU 137	FJB52cl (1020)	1	<i>Steroidobacter denitrificans</i>	EF605262	> 96,9
	OPU 138	SIM86 cl (984)	1	<i>Massilia brevitalea</i>	EF546777	> 97,1
	OPU 139	SIM60cl (869)	1	<i>Massilia artilata</i>	EF688526	> 99,2
	OPU 140	SIB12cl (1040), SIM21cl( 1024)	2	<i>Burkholderia phenazinium</i>	U96936	> 96,3
	OPU 141	FJB45cl (1009)	1	<i>Burkholderia seminalis</i>	AM747631	> 97,3
	OPU 142	SIB3RBco (548)	1	<i>Achromobacter spanius</i>	AY170848	> 99,2
	OPU 143	SIB64cl (999), FJB62cl (942), FJM74cl (935)	3	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	AF176594	> 96,2
Beta- proteobacteria	OPU 144	SIB49cl (1039)	1	<i>Aquabacterium commune</i> sp. tipo	AF035054	> 96,5
	OPU 145	SIB11cl (978)	1	<i>Paucibacter toxinivorans</i> sp. tipo	AY515390	> 97
	OPU 146	SIB48cl (931)	1	<i>Variovorax ginsengisoli</i>	AB245358	>98,7
	OPU 147	FJM21cl (1028)	1	<i>Variovorax boronicumulans</i>	AB300597	> 93,8
	OPU 148	FJM34cl (1059)	1	No cultivable <i>Betaproteobacteria</i> TRA3-20	AB486941	> 99,3
	OPU 149	FJM22cl (1049), FJM71cl (1111)	2	No cultivable <i>Betaproteobacteria</i> TRA3-20	EF516813	>95,6
	OPU 150	FJB33cl (1053)	1	<i>Nitrosospora multiformis</i> - ATCC	CP000103	> 87,6

		25196				
	OPU 151	SIB35cl (1054)	1	<i>Silvimonas amyolytica</i>	AB326111	> 98,2
	OPU 152	FJB26cl (990), SIB70cl (1027), FJM73cl (995), SIB40cl (1009)	4	No cultivable <i>Betaproteobacteria</i> SC-I-84	EU335273	>91,3
	OPU 153	FJM12cl (998), FJM28cl (967)	2	No cultivable <i>Nitrosomonaceae</i>	EF516814	>96
Delta- proteobacteria	OPU 154	SIB27cl (964), SIB10cl (1077), SIB47cl (1024)	3	<i>Haliangium ochraceum</i>	AB016470	>87,4
	OPU 155	FJB81cl (830)	1	No cultivable <i>Deltaproteobacteria</i> GR-WP33-30	HQ645187	>99,8
	OPU 156	FJB41cl (970)	1	No cultivable <i>Deltaproteobacteria</i> GR-WP33-30	AY326580	> 98,3
	OPU 157	FJM78cl (911), FJM39cl (976), FJM25cl (990)	3	<i>Segetibacter koreensis</i>	AB267478	>93
	OPU 158	FJM91cl (929)	1	<i>Segetibacter koreensis</i>	AB267478	> 95,4
	OPU 159	FJM69cl (1040)	1	<i>Segetibacter aerophilus</i>	GQ421847	> 97,8
	OPU 160	FJM53cl (944)	1	<i>Segetibacter aerophilus</i>	GQ421847	> 95,3
	OPU 161	FJM75cl (940)	1	<i>Flavitalea populi</i>	HM130561	> 98,4
	OPU 162	SIB58cl (1036), SIB54cl (1031)	2	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	AB267476	>94,1
	OPU 163	SIB38cl (999), SIB46cl (930), SIM75cl (928)	3	<i>Solibius ginsengiterrae</i>	EF067860	> 89,6
	OPU 164	FJM48cl (960)	1	No cultivable <i>Chitinophagaceae</i> suelo	EF516601	> 97,5
Bacteroidetes	OPU 165	SIB45cl (1024), SIB57cl (1031), SIM13cl (1091), SIB66cl (1019)	4	<i>Ferruginibacter alkalientus</i>	FJ177530	> 90,8
	OPU 166	SIB1cl (1090), FJB46cl (1013)	2	<i>Ferruginibacter alkalientus</i>	FJ177530	> 90,8
	OPU 167	FJM7cl (1049)	1	<i>Pedobacter duraquae</i>	AM491368	>98,1
	OPU 168	FJ13RHco (582)	1	<i>Pedobacter agri</i>	EF660751	>96
	OPU 169	SIB24cl (946)	1	<i>Mucilaginibacter composti</i>	AB267719	> 93,4
	OPU 170	FJB82cl (860)	1	<i>Mucilaginibacter maliensis</i>	FN400859	>98,7
	OPU 171	SIB4cl (1026), SIB79cl (1079), FJB9cl (1019)	3	<i>Mucilaginibacter frigitolerans</i>	FN400860	> 96,2
	OPU 172	FJB22cl (1056), SIB14cl (1019)	2	No cultivable <i>Sphingobacteriales</i> env OPS 17	JX114459	> 93,1
	OPU 173	FJ45LCOco (599)	1	<i>Chryseobacterium soldanellicola</i>	AY883415	> 97,6

OPU 174	SIB3cl (1116), SIB8cl (1075), SIB77cl (987), FJB87cl (970), FJB11cl (1059)	5	No cultivable <i>Acidobacterium</i> - Subgrupo 1- suelo	HQ598861	>98,7
OPU 175	FJB23cl (1044), FJB8cl(848)	2	No cultivable <i>Acidobacterium</i> - Subgrupo 1- suelo	KF035826	> 97,6
OPU 176	SIB6cl (1055), FJB58cl (900), FJB50cl (993), SIB80cl (1017)	4	No cultivable <i>Acidobacterium</i> - Subgrupo 1- suelo	DQ906068	> 96,4
OPU 177	SIB59cl (1014), FJB88cl (980), FJB76cl (900), SIB74cl (985)	4	<i>Telmatobacter bradus</i> sp. tipo	AM887760	>95
OPU 178	FJB85cl (710)	1	<i>Acidicapsa ligni</i>	EU780204	>96,9
OPU 179	SIB68cl (564), SIB2cl (1118)	2	No cultivable <i>Granulicella</i> - Subgrupo 1 suelo	JN023772	> 96,2
OPU 180	SIB73cl (958), FJB89cl (941)	2	No cultivable <i>Granulicella</i> - Subgrupo 1 suelo	HQ598598	> 99
OPU 181	FJB59cl (756), FJM4cl (1014)	2	No cultivable <i>Granulicella</i> - Subgrupo 1 suelo	HQ599071	> 98,3
OPU 182	SIB22cl (554), FJB64cl (899), FJB56cl (977)	3	No cultivable <i>Edaphobacter</i> - Subgrupo 1	GQ402710	> 96,4
OPU 183	SIB65cl (999), FJB77cl (900)	2	<i>Granulicella paludicola</i>	AM887758	> 97
OPU 184	SIB42cl (974)	1	No cultivable <i>Granulicella</i> - Subgrupo 1 suelo	FJ004689	> 98,9
OPU 185	FJB54cl (867)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> - Subgrupo 1- suelo	HQ598886	> 99,3
OPU 186	SIM78cl (904)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> - Subgrupo 1- suelo	HM748748	>99,8
OPU 187	FJB30cl (1020)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> - Subgrupo 1- suelo	FJ004691	> 99,3
OPU 188	SIB20cl (1018), SIB69cl (996)	2	No cultivable <i>Acidobacteria</i> - Subgrupo 1- suelo	HQ598581	> 98,2
OPU 189	SIM50cl (1012)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> - Subgrupo 1- suelo	JN023657	> 96,3
OPU 190	FJB24cl (1008)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> - Subgrupo 1- suelo	EF018237	> 96,4
OPU 191	SIM38cl (906), FJB7cl (870), SIM15cl (981), FJM1cl (1011)	4	No cultivable <i>Bryobacter</i> - Subgrupo 3	FJ466022	>95,6
OPU 192	SIB83cl (900)	1	No cultivable <i>Bryobacter</i> - Subgrupo 3	AF465658	> 96,7
OPU 193	SIB18cl (1028)	1	No cultivable <i>Bryobacter</i> -	DQ984552	>97,6

*Acidobacteria*

		Subgrupo 3				
OPU 194	FJB27cl (1002)	1	No cultivable <i>Bryobacter</i> - Subgrupo 3	EF019891	>97,2	
OPU 195	FJB32cl (1012)	1	No cultivable <i>Bryobacter</i> - Subgrupo 3	HQ597932	> 98,5	
OPU 196	SIM25cl (986), FJM77cl (949)	2	No cultivable <i>Solibacter</i> - Subgrupo 3	EF516290	> 99,2	
OPU 197	FJB35cl (1007)	1	No cultivable <i>Solibacter</i> - Subgrupo 3	EU132242	> 98	
OPU 198	SIB86cl(972)	1	No cultivable <i>Solibacter</i> - Subgrupo 3	FJ466142	> 99,6	
OPU 199	SIM58cl (986)	1	No cultivable <i>Solibacter</i> - Subgrupo 3	DQ298003	> 96,7	
OPU 200	FJB44cl (953)	1	No cultivable suelo boscoso - <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 2	AY913273	> 98,4	
OPU 201	SIB84cl (999)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 2	Y07646	> 96,7	
OPU 202	FJB53cl (907)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 2	HM187179	>95,4	
OPU 203	FJB12cl (994)	1	No cultivable suelo boscoso - <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 2	AY913275	> 97	
OPU 204	SIB16cl (1065)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 2	EF019283	> 95,6	
OPU 205	SIB50cl (1009), FJB68cl (951), FJB38cl (986)	3	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 6	JN580019	>89	
OPU 206	FJM76cl (949)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 6	EU202759	> 93,7	
OPU 207	FJM44cl (1043)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 6	JQ428111	> 95	
OPU 208	FJB6cl (979)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 6	HM062340	> 93,4	
OPU 209	FJB86cl (950)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 6	HM062340	> 84,5	
OPU 210	FJM30cl (986)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 4	AY395342	>94,1	
OPU 211	FJM16cl (990)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> Subgrupo 4	EU132354	>96,3	
OPU 212	SIM26cl (1010)	1	No cultivable <i>Acidobacteria</i> - Holophage subgrupo 7	HQ645210	> 95,3	
WD272	OPU 213	SIB31cl (898)	1	No cultivable Bacteria no clasificable WS272	JN024039	>97

	OPU 214	SIM53cl (975)	1	No cultivable bacteria no clasificable WS272	FJ466073	> 97
	OPU 215	FJB21cl (932), FJB57cl (958)	2	No cultivable bacteria no clasificable WS272	FJ625369	>96,1
WS3	OPU 216	FJB91cl (717)	1	No cultivable candidato division WS3	EU135570	> 96,4
	OPU 217	FJM66cl (1040)	1	No cultivable <i>Pirellula</i> - suelo	AB672126	>97,9
	OPU 218	FJM67cl (1054)	1	No cultivable <i>Planctomycetales</i> - suelo	AM935404	> 92,6
	OPU 219	SIM57cl (1070), SIM5cl (1038)	2	No cultivable <i>Planctomycetales</i> - LX124	KC854918	>98,3
	OPU 220	FJM8cl (798)	1	No cultivable <i>Planctomycetales</i> - suelo	HQ119189	>94,7
	OPU 221	FJM81cl (961)	1	No cultivable <i>Planctomyces</i> - Division WD2101 suelo group	EF516309	> 96,3
<i>Planctomyces</i>	OPU 222	SIM82cl (993)	1	No cultivable <i>Planctomyces</i> - Division WD2101 suelo	AY673166	> 96
	OPU 223	FJM63cl (1024), SIM90cl (950)	2	No cultivable <i>Planctomyces</i> - Division WD2101 suelo	EU135116	> 93
	OPU 224	SIM37cl (1015)	1	No cultivable <i>Planctomyces</i> - Division WD2101 suelo	JQ769862	> 96
	OPU 225	SIM39cl (978)	1	No cultivable <i>Planctomyces</i> - Division WD2101 suelo group	EU135116	> 93
<i>Verrucomicrobia</i>	OPU 226	SIM43cl (994)	1	No cultivable <i>Verrucomicrobia</i> OPB35	AB637067	> 96