

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



“RESPUESTA DE LA MICROBIOTA DE SUELOS ARIDOS Y SEMIARIDOS A pH ACIDOS”

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado académico de Magister en Bioquímica área de
especialización en Bioquímica Ambiental y
Memoria para optar al título profesional de Bioquímico**

Por:

Natalia Paula Peñaloza Lecaros

Directores de Tesis

Dra. Margarita Carú Marambio

**SANTIAGO- CHILE
2011**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

NATALIA PAULA PEÑALOZA LECAROS

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Bioquímica área de especialización Bioquímica Ambiental y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de Tesis rendido el día **06 de junio** de 2011.

Directores de Tesis:

Dra. Margarita Carú Marambio

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez A. (Presidente)

Dr. Davor Cotorás T.

Dr. Rubén Polanco O.

AGRADECIMIENTOS

Este camino ha sido bastante largo y no exento de baches. Es por lo mismo que hoy no puedo dejar pasar esta oportunidad sin agradecer a quienes siempre estuvieron conmigo brindándome su apoyo en todos los momentos vividos.

Agradezco especialmente a mi esposo Christopher (Cuto) quien ha sido para mí fundamental en este recorrido, por sus palabras, comprensión y apoyo incondicional en todos los momentos vividos tanto de formación profesional como de crecimiento personal.

(The Story- Brandie Carlile)

A mis padres Manuel y Patricia, a mis hermanos Francisco y Daniela que desde siempre me han acompañado y que durante este proceso formativo siempre tuvieron palabras para alentar, animar o felicitar en los momentos oportunos y aunque las cosas no siempre fueran óptimas siempre lograron sacarme una sonrisa cuando así lo necesité.

A mis amigas, compañeras de carrera, María Elsa Pando, Ximena González y Romina Cataldo por todas esas sesiones de conversaciones interminables, en donde hacíamos “coaching” para liberar el estrés y enfocarnos en lo que era realmente importante.

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación académica, especialmente a aquellos que además tuvieron palabras sabias aplicables a otras áreas de la vida.

A mi profesora Margarita y a mis compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana, a los que aún están y a los que estuvieron, por hacer del lab algo más que un lugar de trabajo.

A Marisol, Catalina y Madeleine por su apoyo durante estos años y por la amistad construida.

A Julieta por su ayuda constante a todos los que estamos en el laboratorio y a Juanita por la preocupación por cada persona del laboratorio.

Finalmente agradecer al proyecto Fondecyt 1080280, gracias al cual fue posible esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
1.-Introducción	1
Hipótesis	6
Objetivos General y Específicos	6
2.- Metodología	8
<i>2.1. Diseño y montaje de los microcosmos</i>	<i>8</i>
<i>2.2. Cultivo y aislamiento de microorganismos</i>	<i>10</i>
<i>2.3. Identificación de aislados bacterianos: extracción y amplificación de DNA</i>	<i>11</i>
<i>2.4. Identificación de aislados fúngicos: extracción y amplificación de DNA</i>	<i>12</i>
<i>2.5. Curvas de crecimiento de los microorganismos aislados a pH3</i>	<i>14</i>
<i>2.6. Perfiles de TRFLP de bacterias y hongos de los microcosmos de suelos árido y semiárido a pH3</i>	<i>15</i>
<i>2.7. Genotecas bacteriana y fúngica del microcosmos de suelo árido a pH3</i>	<i>16</i>
3.- Resultados	18
<i>3.1. Montaje de los microcosmos y medición del pH</i>	<i>18</i>
<i>3.2. Recuento de unidades formadoras de colonia durante la incubación de los microcosmos</i>	<i>21</i>
<i>3.3. Aislamiento de colonias fúngicas y bacterianas desde los microcosmos tratados</i>	<i>25</i>
<i>3.4. Identificación de los aislados bacterianos y fúngicos obtenidos a pH3</i>	<i>27</i>

<i>3.5. Determinación de las tasas de crecimiento específicas de los aislados bacterianos y las velocidades de crecimiento radial de los aislados fúngicos obtenidos a pH 3</i>	31
<i>3.6. Perfiles de TRFLP de bacterias y hongos de los microcosmos de suelos árido y semiárido a pH3</i>	34
<i>3.7. Genotecas bacteriana y fúngica del microcosmos de suelo árido a pH3</i>	38
4.- Discusión	42
5.- Conclusiones	53
6.-Bibliografía	55
Anexos	
Cálculo de la tasa específica de crecimiento	
Morfología de la colonia de aislados bacterianos	
Morfología de los aislados fúngicos	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Partidores utilizados para la identificación bacteriana y fúngica	13
Tabla 2	Identificación de los aislados bacterianos procedentes de los microcosmos de suelo semiárido tratados con medio a pH 3.	27
Tabla 3	Identificación de los aislados fúngicos procedentes de los microcosmos de suelo semiárido y árido tratados con medio a pH 3.	28
Tabla 4	Matriz de presencia ausencia de los aislados según el tratamiento del microcosmos a) bacterianos de suelo árido b) fúngicos de suelo semiárido y c) fúngicos de suelo árido	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ubicación geográfica del punto de procedencia de las muestras de suelo: a) semiárido; b) árido.	10
Figura 2	Variación del pH en los microcosmos de suelo semiárido tratados con medio a diferentes pHs (azul, medio a pH 3; rojo, medio a pH 5; verde, medio a pH 7); a) microcosmos decantados; b) microcosmos centrifugados.	19
Figura 3	Variación del pH en los microcosmos de suelo árido tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7). a) microcosmos decantados. b) microcosmos centrifugados.	20
Figura 4	Unidades formadoras de colonia bacterianas totales por gramo de suelo en los microcosmos tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7). a) microcosmos de suelos semiáridos. b) microcosmos de suelos áridos.	22
Figura 5	Unidades formadoras de colonia fúngicas totales por gramo de suelo en los microcosmos tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7). a) microcosmos de suelos semiáridos. b) microcosmos de suelos áridos	23
Figura 6	Relación bacterias:hongos en base a las unidades formadoras de colonia bacterianas y fúngicas en los microcosmos tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7). a) microcosmos de suelo semiárido. b) microcosmos de suelo árido.	25
Figura 7	Frecuencia relativa de los morfotipos bacterianos y fúngicos aislados en los microcosmos de suelo árido y semiárido tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7).	26
Figura 8	Tasas de crecimiento bacterianas específicas μ (1/h) de los aislados obtenidos desde los microcosmos de suelo semiárido cultivados a diferentes pHs (azul, medio a pH 3; rojo, medio a pH 5; verde, medio a pH 7).	32
Figura 9	Velocidad de crecimiento radial promedio de los aislados fúngicos obtenidos desde los microcosmos de suelo semiárido cultivados a diferentes pHs (azul, medio a 3; rojo, medio a pH 5; verde, medio	33

a pH 7).

- Figura 10** Velocidad de crecimiento de los aislados fúngicos obtenidos desde los microcosmos de suelo árido cultivados a diferentes pHs (azul, medio a pH 3; rojo, medio a pH 5; verde, medio a pH 7). 34
- Figura 11** Frecuencia relativa de los fragmentos terminales de restricción de la comunidad bacteriana en los microcosmos (centrifugado) de suelo semiárido tratados con medio a diferentes pHs (3, 5, 7). a) enzima de restricción *HaeIII*. b) enzima de restricción *MspI* 36
- Figura 12** Frecuencia relativa de los fragmentos terminales de restricción de la comunidad bacteriana en los microcosmos (centrifugado) de suelo árido tratados con medio a diferentes pHs (3, 5, 7). a) enzima de restricción *HaeIII*. b) enzima de restricción *MspI*. 37
- Figura 13** Fragmentos terminales de restricción de la comunidad fúngica en los microcosmos (centrifugado) de suelo semiárido tratados con medio a diferentes pHs (3, 5, 7). a) enzima de restricción *HaeIII*. b) enzima de restricción *MspI*. 37
- Figura 14** Fragmentos terminales de restricción de la comunidad fúngica en los microcosmos (centrifugado) de suelo árido tratados con medio a diferentes pHs (3, 5, 7). a) enzima de restricción *HaeIII*. b) enzima de restricción *MspI*. 38
- Figura 15** Abundancia relativa de los diferentes grupos taxonómicos bacterianos basados en las secuencias de los clones del gen del rRNA 16S del suelo árido tratado con medio a pH 3. 40
- Figura 16** Abundancia relativa de los diferentes grupos taxonómicos fúngicos, a nivel de clase, basados en las secuencias de los clones de la región ribosomal intergénica (ITS) del suelo árido tratado con medio a pH 3. 41

LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS

BSA	Seroalbúmina de bovino
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxirribonucleótido trifosfato)
ITS	internal transcribed spacer
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Información Biotecnológica)
OTU	Unidades Taxonómicas Operacionales
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
TRFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)
TRF	Terminal Restriction Fragment (Fragmento terminal de restricción)
TRFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)
UF	Unidades de fluorescencia
UFC	Unidades formadoras de Colonias

RESUMEN

Los suelos de ecosistemas áridos y semiáridos se caracterizan por baja abundancia y actividad microbiana y se ha sugerido que la microbiota de estos ambientes extremos tendría una composición particular que podría responder de manera diferente a las perturbaciones ambientales.

El parámetro que se propone estudiar es el pH, ya que es considerado a nivel global el mejor descriptor de la diversidad y composición de ensamblajes microbianos del suelo. Actualmente se observan varios fenómenos que provocan una modificación del pH en el suelo, entre ellos se destacan la precipitación ó lluvia ácida y los drenajes ácidos de mina. En Chile no se dispone de información acerca de este tipo de perturbaciones y cómo afectan a las comunidades microbianas del suelo.

El pH puede tener numerosos efectos no sólo sobre la actividad metabólica de los microorganismos sino también sobre los patrones de distribución, abundancia y diversidad de la misma. Por otra parte, si el suelo es un importante reservorio de diversidad microbiana, cambios drásticos de pH podrían hacer abundantes poblaciones microbianas minoritarias del suelo modificando la diversidad genética y funcional de estos ensamblajes microbianos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del pH ácido sobre la diversidad de las comunidades microbianas de suelos áridos y semiáridos, mediante aproximaciones dependientes e independientes de cultivo.

Los resultados indicaron que los tratamientos crónicos de microcosmos de suelos áridos y semiáridos con medio a pH ácido, no provocaron una disminución marcada en el

pH del suelo árido, lo que puede deberse al efecto amortiguador del mismo. Sin embargo, el pH del suelo semiárido alcanzó valores cercanos a pH 4,5 en todos los tratamientos.

Por otra parte, cuando se procedió a caracterizar los microcosmos mediante recuento de colonias, aislamiento y cultivo, se obtuvieron colonias bacterianas y fúngicas a pH 3 desde microcosmos de suelo semiárido, pero no se obtuvieron aislados bacterianos desde el microcosmos de suelo árido tratado a pH 3 en los tiempos finales de tratamiento. Todos los cultivos bacterianos del suelo semiárido aislados a pH 3 pertenecen al género *Rhodospirillum* resultan ser ácido tolerantes, pero no acidófilos. Los aislados fúngicos obtenidos de ambos suelos acidificados pertenecen en su mayoría al grupo ascomycota. Las velocidades de crecimiento de los aislados fúngicos indican que la mayoría de los hongos que provienen del suelo semiárido crecen más lento que los hongos aislados desde el suelo árido. Algunos aislados fúngicos mostraron mayor velocidad de crecimiento a pH 3, aunque la mayoría fueron tolerantes a las condiciones ácidas, ellos crecen mejor a pH más altos.

La comunidad bacteriana de ambos suelos mostró patrones de TRFLP diferentes cuando disminuyó el pH. Los patrones de TRFLP bacteriano fueron más diversos que los patrones de TRFLP de las comunidades fúngicas, éstos últimos presentan diferencias menores con el tratamiento ácido, indicando que las comunidades fúngicas son más resistentes a la perturbación estudiada. Finalmente, se determinó que la disminución del pH produjo cambios en la composición de filotipos y estructura de las comunidades microbianas de los microcosmos de suelos árido y semiárido.

ABSTRACT

The arid and semiarid soils ecosystems are characterized by low abundance and microbial activity and has been suggested that the microbiota of these extreme environments have a particular composition that could respond differently to environmental disruptions.

The parameter proposed study is the pH, since it is globally considered the best descriptor of the diversity and composition of soil microbial assemblages. Currently, several phenomena are observed which cause a change in the pH soil, including acid rain and acid mine drainage. In Chile, there is no information about this type of disturbances and how they affect soil microbial communities.

The pH can have numerous effects not only on the metabolic activity of microorganisms but also on patterns of distribution, abundance and diversity. On the other hand, if the soil is a major reservoir of microbial diversity, drastic changes in pH could cause that those minority microbial soil populations becomes abundant, modifying the genetic and functional diversity of these microbial assemblages.

The aim of this work was evaluate the effect of acid pH on the diversity of microbial communities in arid and semi-arid soils, using culture dependent and independent approaches.

The results indicated that chronic treatments of arid and semi-arid soils with medium to low pH, in a microcosm assay, did not cause a marked decrease in the pH of arid soil, which may be due to the buffer effect of the same. However, the semi-arid soil pH reached values close to pH 4.5 in all treatments.

On the other hand, when we proceeded to characterize the microcosms by counting

colonies, isolation and cultivation, bacterial and fungal colonies were obtained at pH 3 from soil microcosm semiarid, but not bacterial isolates were obtained from the arid soil microcosms treated at pH 3 at the end times of treatment All semi-arid soil bacteria isolates at pH 3 belong to the genus *Rhodospirillum* and they are acid tolerant but no acidophile, The fungal isolates obtained from both acidified soils are mostly Ascomycota group. Growth rates of fungal isolates indicate that the majority of fungi isolated from semiarid soil grow slower than fungi isolated from the arid soil. Some fungal isolates showed a high growth rate at pH 3, although the most of them were tolerant to the acidic conditions, they have greater growth rate at higher pH.

The bacterial community from both soils exhibited distinctive TRFLP patterns when decrease of pH. T RFLP patterns of bacterial communities were more diverse than T RFLP profiles of fungal communities and exhibiting little differences with acid treatment, this result suggest that fungal communities are more resistant to the disturbance. Finally, we determined that decrease of pH induced changes in the phylotypes composition and structure of microbial communities in microcosms of semi-arid soil.

INTRODUCCIÓN

Los procesos microbianos dominan la biogeoquímica global. Éstos representan aproximadamente la mitad de la fotosíntesis y casi toda la descomposición de la materia orgánica, nitrificación, desnitrificación, producción de metano, entre otros (Schlesinger y cols., 1997), además influenciarían directa e indirectamente la productividad, diversidad y composición de las comunidades de plantas (Van der Heijden y cols., 2008). No obstante, el papel de la estructura y composición de los microorganismos en estos procesos ecosistémicos se considera frecuentemente una caja negra, aun cuando las variaciones de la estructura y fisiología de la microbiota pueden tener un gran impacto sobre los ciclos biogeoquímicos globales (Schimel 2004). Asimismo, los factores que controlan la distribución y abundancia de los microorganismos del suelo continúan estando pobremente entendidos (Rousk 2010).

La biomasa microbiana está compuesta por una gran diversidad de microorganismos, donde las bacterias y los hongos constituyen el mayor grupo en el suelo. En general, se estima que la biomasa bacteriana es inferior a la biomasa fúngica, pero la densidad de las bacterias es alrededor de cien veces más elevada que la de los hongos; además, taxonómicamente, la biota bacteriana del suelo es menos conocida que la fúngica (Bardgett, 2005; Varnero 2008).

Los sistemas áridos y los semiáridos representan un 19% y un 14,6% de los ecosistemas terrestres, respectivamente (Meigs 1953). En Chile las regiones áridas y semiáridas cubren una superficie aproximada de 16,5 millones de hectáreas, las cuales representan el 22% del territorio nacional. (Gajardo 1994). Entre estas regiones, el desierto de Atacama y el matorral esclerófilo de Chile Central son ejemplos de suelos áridos y

semiáridos respectivamente. Se ha postulado que las regiones áridas podrían responder tempranamente a los efectos del cambio climático debido a que los procesos ecosistémicos en estos ambientes están estrechamente acoplados a las precipitaciones (OIES 1991) y por lo tanto es esperable que ocurran cambios en los parámetros edáficos y en la actividad y/o diversidad microbiana. Según datos de biodiversidad microbiana, en Chile, los bajos niveles de materia orgánica y de nitrógeno que presentan los suelos áridos y semiáridos, como una consecuencia del déficit hídrico permanente a que están sometidos, determinarían la existencia de ecosistemas simplificados con una mínima productividad y una reducida densidad microbiana (Varnero 2008). No obstante, algunos antecedentes indican que el suelo de estos ambientes sustenta una alta diversidad microbiana (Farías 2006; Orlando y cols., 2007; Orlando y cols., 2010).

Estudios de la microbiota del suelo de áridos se han centrado principalmente en las costras biológicas (Yeager y cols., 2004; Nagy y cols., 2005; Stursova y cols., 2006), y aunque éstas son comunes en la mayoría de los desiertos, en Atacama sólo se han descrito en pocos sectores cercanos a la costa en la localidad de Caldera y cerca de Antofagasta (Friedmann 1993; Forest & Weston 1996; Büdel 2003). Por su parte, en ecosistemas semiáridos se han estudiado principalmente las comunidades microbianas asociadas a las plantas (Waldrop & Firestone 2006; Orlando y cols., 2007; Orlando y cols., 2010), ambientes conocidos como islas de fertilidad, sin embargo hay menos estudios de la microbiota en suelos sin cobertura vegetal. Estas islas de fertilidad presentan un mayor contenido de nutrientes (Johnson 1995; Schlesinger y cols., 1997; Kieft y cols., 1998; Erickson y cols., 2005) y una mayor biomasa microbiana (Gallardo & Schlesinger 1992) que el suelo sin cobertura vegetal. Sin embargo, otros autores han encontrado que las

comunidades asociadas a plantas de praderas semiáridas fueron igualmente complejas que las presentes en suelo desnudo, aún cuando mostraron diferentes patrones de diversidad genética (Kuske y cols., 2002; Farías 2006; Farías y cols., 2009; Orlando y cols., 2007).

En general, los suelos áridos y semiáridos se caracterizan por baja abundancia y actividad microbiana reducida. Los valores de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo encontrados para poblaciones bacterianas aeróbicas en suelos áridos a través del mundo varían entre menos de 10 a $1,6 \times 10^7$ UFC/g (Bhatnagar & Bhatnagar 2005). Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio muestran que en suelos áridos y semiáridos de Chile, las bacterias cultivables alcanzaron valores de 10^6 y 10^7 UFC/g, respectivamente (Orlando y cols., al 2007; Orlando y cols., 2010). Los suelos de los matorrales semiáridos han sido menos estudiados, análisis de los patrones comunitarios mediante de TRFLP sugieren que la comunidad bacteriana en el matorral esclerófilo de Chile Central está compuesta principalmente por proteobacterias, representando un 50% de los TRFs (Farías 2006), mientras que la comunidad fúngica se caracterizó por una marcada dominancia del grupo Ascomycota en todas las genotecas analizadas (Farías 2011). Los estudios realizados en suelos hiperáridos del desierto de Atacama mostraron una dominancia de los phyla bacterianos Planctomycetes y Gemmatimonadetes (Drees y cols., 2006) que, según la literatura, no sobrepasan el 2% de los clones obtenidos en la mayoría de los suelos (Janssen 2006); por su parte la comunidad fúngica también estuvo dominada por ascomicetes (Farías 2011). Esto sugiere que la microbiota de estos ambientes extremos tendría una composición particular que podría responder de manera diferente a las perturbaciones ambientales.

Existen estudios que demuestran que los cambios en las comunidades microbianas a través del espacio son a menudo fuertemente correlacionados a las diferencias en la química de los suelos (Rousk y cols., 2010). El pH del suelo afecta la forma química, concentración y disponibilidad de los sustratos e influye en el crecimiento y la actividad celular (Nicol y cols., 2008). Algunos antecedentes indican que la precipitación ácida tiene efectos directos e indirectos sobre el tamaño, composición, y actividad de microorganismos en suelos forestales y agrícolas (Bewley & Stotzky 1983; Prescott & Parkinson 1985; Pennanen y cols., 1998). Cambios en la estructura de la comunidad microbiana se detectaron con la fertilización orgánica, la cual produjo una disminución en el pH, resultando en la selección de los microorganismos adaptados a esa situación (Enwall y cols., 2005). También se ha observado que el pH afecta la composición de comunidades desnitrificadoras en el suelo (Enwall y cols., 2005). Asimismo, se ha visto que los efectos de la acidificación en suelos tendría un impacto en la relación hongos:bacterias en suelos forestales y cultivables (Strickland y Rousk 2010). Sin embargo, existen indicios que los patrones espaciales exhibidos por las comunidades fúngicas estarían menos correlacionados con el pH del suelo (Rousk y cols., 2010), a diferencia de lo descrito para las comunidades bacterianas (Fierer & Jackson 2006). Estudios de los hongos micorrízicos, con los cuáles la mayoría de las plantas viven en simbiosis, indican que éstos podrían eventualmente verse perjudicados por la acidificación del suelo (Pereira y cols., 2007).

Los cambios de pH en el suelo se pueden producir por diferentes causas, una de ellas es el impacto antropogénico como es el caso de la precipitación ácida causada por el aumento de las emisiones de SO₂ y NO_x que forman ácido sulfúrico y ácido nítrico en la atmósfera, en la cual forman parte del material particulado responsable de la contaminación

atmosférica (Querol y cols., 2001) y debido al corto tiempo de residencia, retorna en su mayoría a la superficie de la Tierra. Esta precipitación puede ser húmeda o seca y se conoce como “*precipitación ácida*” por los bajos valores de pH (< 4,6) que presenta. Por otra parte, aunque las emisiones de NH₃ neutralizarían la precipitación o incluso la alcalinizarían, igualmente podrían producir acidificación de los suelos a través del proceso de nitrificación (Menz & Seip 2004). Otro factor que produce cambios drásticos del pH del suelo es la actividad minera. En los suelos donde hay extracción de minerales, el pH se modifica notablemente por el fenómeno conocido como drenaje ácido de mina, el cual se produce por oxidación química y biológica de sulfuros que quedan expuestos en la superficie (Haferburg & Kothe 2007). Los drenajes ácidos de mina son de extrema toxicidad para la mayoría de los organismos, sin embargo, hay microorganismos que prosperan en este tipo de ambientes y llevan a cabo importantes reacciones biogeoquímicas. Existe evidencia de que la diversidad filogenética de procariontes en estos hábitats es alta (Haferburg & Kothe 2007), sin embargo, otros autores señalan que en ellos hay una muy limitada diversidad microbiana (Leveille y cols., 2001). El número, diversidad de especies y actividades de los microorganismos del suelo varían según los cambios ambientales, por tanto, es necesario identificar y entender las condiciones ambientales que influyen en el crecimiento y actividad de los microorganismos.

Por lo tanto, perturbaciones crónicas como cambios en el pH del suelo alteran la diversidad genética y funcional de la microbiota y en consecuencia afectan los procesos ecosistémicos que controlan (Wolters y cols., 2000). Los datos disponibles en la actualidad sugieren que las comunidades microbianas pueden ser consistentemente alteradas por cambios globales y que estos cambios pueden tener implicancia en los ciclos

biogeoquímicos y en la función del ecosistema (Horz y cols., 2004). Según McCann (2000), la estabilidad de los ecosistemas depende de la habilidad de las comunidades de sustentar especies o grupos funcionales capaces de responder diferencialmente a factores bióticos y abióticos. Si a mayor biodiversidad se favorece la estabilidad ecológica, entonces la acelerada pérdida de especies puede afectar la estabilidad y resiliencia de los ecosistemas. Si bien esta aseveración está generalmente pensada en términos de flora y fauna, podría también aplicarse a las comunidades microbianas.

De acuerdo a los antecedentes entregados, se pretende evaluar si un cambio en el pH del suelo de microcosmos modificará la diversidad de la comunidad bacteriana y fúngica del suelo. Para esto, se plantea la siguiente **Hipótesis**: “ La acidificación del suelo produciría cambios en la diversidad de las comunidades microbianas de suelos áridos y semiáridos , siendo más afectadas las poblaciones bacterianas que las fúngicas, dado que estas últimas se describen como más resistentes a las condiciones ácidas”.

Para abordar este problema se realizaron ensayos de microcosmos con suelo semiárido derivado del matorral esclerófilo de Chile central y suelo árido proveniente del matorral subdesértico del Desierto de Atacama. La microbiota de estos suelos puede ser especialmente sensible a los factores ensayados debido a su menor abundancia y actividad, comparada con suelos forestales y agrícolas.

El **Objetivo General** de esta tesis fue: Evaluar el efecto del pH ácido sobre la diversidad de las comunidades microbianas de suelos áridos y semiáridos, mediante aproximaciones dependientes e independientes de cultivo.

Como **Objetivos Específicos** se plantearon los siguientes:

1. Aislar e identificar microorganismos desde la microbiota de suelos áridos y semiáridos sometidos a una perturbación crónica de pH ácido.
2. Determinar el crecimiento de los aislados a los pHs estudiados.
3. Determinar el efecto de la acidificación de los microcosmos sobre la composición de la microbiota por métodos independientes de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño y montaje de los microcosmos

Las muestras para la construcción de microcosmos se obtuvieron desde:

a) Suelo semiárido, del matorral esclerófilo de la localidad “El Romeral” (33°48’S, 70°14’W), Cajón del Maipo, Región Metropolitana, Chile. El sector presenta un clima mediterráneo seco con precipitaciones invernales con un promedio anual de 350 mm (Gajardo 1994) (Figura 1a).

b) Suelo árido, del matorral subdesértico de “Sierra Pajarito” (27°59’S, 70°34’W), Desierto de Atacama, III Región, Chile. Este sector se caracteriza por un clima desértico árido con escasas precipitaciones con un promedio anual de 17 mm (Mc Kay y cols., 2003) (Figura 1b).

Las muestras de suelos para la construcción del microcosmo se obtuvieron desde el horizonte superficial del suelo. En cada sitio de estudio se tomaron 10 muestras simples de suelo a 10 cm de profundidad. Teniendo en cuenta que el objetivo de este trabajo fue contrastar los ensambles microbianos en dos sistemas diferentes, las muestras de cada sitio se homogeneizaron para obtener una muestra compuesta de cada uno con el objetivo de reducir la heterogeneidad espacial a pequeña escala (Webster y cols., 2002; Girvan y cols., 2003) y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Los microcosmos se construyeron por duplicado en tubos Falcon™ de 15 mL con 1g de la muestra compuesta de cada suelo y 3 mL de medio salino BAP (0,20 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,07 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5,00 mM NH_4Cl ; 0,02 mM FeEDTA ;

micronutrientes 1ml/L (solución stock: 2,86 g/L H_3BO_3 ; 1,81 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,22 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,08 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,025 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,001 g/L $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a pH 3, 5 y 7. La acidificación o alcalinización del medio se obtuvo usando HCl 1M o NaOH 1M, respectivamente. Los microcosmos se incubaron a 25°C con agitación y cada 2 días se realizó el recambio de medio utilizando dos estrategias diferentes: un set de tubos se dejó decantar durante 2 h y el otro set de tubos se centrifugó durante 5 min a 1750g, luego se extrajo la fase líquida y se realizó el recambio de medio (el volumen extraído fue reemplazado por el mismo volumen de medio al pH correspondiente). Los recambios se realizaron 12 veces para cada microcosmos. El pH del suelo en los microcosmos se midió mediante potenciometría desde el medio líquido luego de centrifugar o dejar decantar en cada recambio de medio.

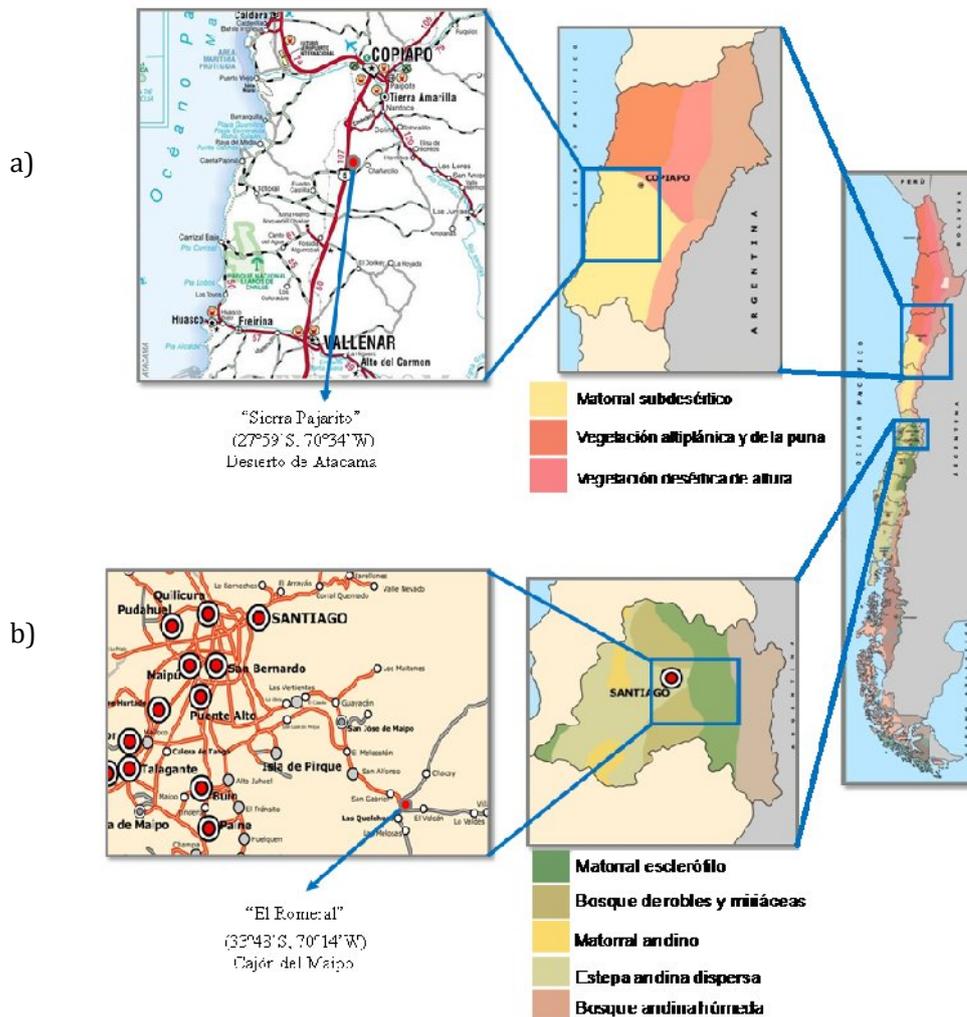


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de procedencia de las muestras de suelo: a) semiárido; b) árido.

2.2. Cultivo y aislamiento de microorganismos

A partir de la fase líquida recuperada de cada tratamiento (decantado y centrifugado) se hicieron diluciones seriadas para determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) en cada microcosmos para cada tiempo de recambio. Para ello, se transfirió

100 μ L de cada dilución a placas Petri con 20 mL de medio sólido BAP con agar (2%) a los pHs correspondientes y se incubaron a temperatura ambiente durante una semana. Las colonias se clasificaron morfológicamente en base a su tamaño, forma, características del borde, elevación de la colonia y pigmentación según fuese aislado bacteriano o fúngico. Tanto los hongos como las bacterias fueron posteriormente aislados y cultivados en tubos con medio sólido BAP y almacenados para su posterior análisis.

2.3. Identificación de aislados bacterianos: extracción y amplificación de DNA

Para la extracción de DNA, cada una de las colonias aisladas se resuspendió en 10 μ L de buffer TE (10 μ M Tris-HCl y 1 μ M de EDTA) y se realizó una lisis térmica de 8 ciclos de 1 min a 98°C y 1 min a 4°C. La concentración del DNA se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE teñidos con GelRed (Biotium) y se visualizó con luz ultravioleta.

Posteriormente se amplificó el gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los partidores universales fD1 y rP2 (Tabla1). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 μ L que contenía GoTaq[®] Green Master Mix (GoTaq[®] DNA Polimerasa en buffer de reacción Green GoTaq[®] 1X pH 8,5; 200 μ M de cada dNTP y 1,5 mM MgCl₂) (Promega) y los partidores antes mencionados a una concentración de 200 nM cada uno. A esta mezcla se agregó 1 μ L del DNA templado extraído desde los lisados bacterianos.

El programa de amplificación consistió en una etapa inicial de denaturación de 3 min a 94°C, seguida por 30 ciclos de 1 min a 94°C, una etapa de hibridación de 30 s a 57°C

y una de elongación de 2 min a 72°C. Finalmente se realizó una extensión de 20 min a 72°C. La correcta amplificación y el tamaño esperado de los amplicones (1500 pb) se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en buffer TAE teñido con GelRed (Biotium) y visualizado bajo luz ultravioleta. Para determinar el tamaño del fragmento se usó el marcador 100 bp (Invitrogen).

Los amplicones derivados del gen del rRNA 16S se secuenciaron en un analizador genético ABI 1.6.0 (Macrogen, Inc.). La identidad de las secuencias se evaluó utilizando el banco de datos del NCBI utilizando la herramienta BLASTN (Altschul y cols., 1997) por comparación con las secuencias de los organismos cultivados más relacionados.

2.4. Identificación de aislados fúngicos: extracción y amplificación de DNA

El DNA fúngico se obtuvo a partir de 0,25 g de micelio de cada colonia aislada, empleando el kit de extracción “Ultraclean Microbial DNA isolation Kit” (MoBio Lab., Inc.). El DNA obtenido se resuspendió en 50 µL de buffer TE (10 µM Tris-HCl y 1 µM de EDTA). La concentración del DNA se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE teñidos con GelRed (Biotium) y se visualizó con luz ultravioleta.

La amplificación del DNA extraído se realizó con los partidores universales ITS1 e ITS4 que amplifican la región ribosomal intergénica (Tabla 1).

La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, que incluía 1 µl de DNA de cada aislado, GoTaq[®] Green Master Mix (GoTaq[®] DNA Polimerasa en 1X Green GoTaq[®]

Reaction Buffer (pH 8,5), 200 μ M de cada dNTP y 1,5 mM MgCl₂) (Promega) y los partidores a una concentración final de 0,4 μ M.

Tabla 1. Partidores utilizados para la identificación bacteriana y fúngica.

Gen	Partidores	Secuencia (5'-3')	Referencia
rDNA 16S	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg y cols. 1991
	rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Gardes y Bruns 1993
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Los ciclos térmicos para la amplificación consistieron en una denaturación inicial de 3 min a 94°C, seguida por 37 ciclos de denaturación durante 1 min a 94°C luego una hibridación de 30 s a 55°C, 3 min de extensión a 72°C y finalmente una extensión de 20 min a 72°C. Los productos de amplificación se verificaron y cuantificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en buffer TAE teñidos con GelRed (Biotium) y visualizados mediante luz ultravioleta.

Los amplicones derivados de la región ITS se secuenciaron en un analizador genético ABI 1.6.0 (Macrogen, Inc.). La identidad de las secuencias se evaluó utilizando el banco de datos del NCBI utilizando la herramienta BLASTN (Altschul y cols., 1997) por comparación con las secuencias de los organismos cultivados más relacionados.

2.5. Curvas de crecimiento de los microorganismos aislados a pH 3

Las curvas de crecimiento de los aislados fúngicos obtenidos a pH 3 se determinaron en base a la medición del crecimiento radial (mm/día) de la colonia en placas con medio salino BAP con agar al 2,0% suplementado con 1% de sacarosa a pH 3, 5 y 7. Para esto se transfirieron discos de micelio, de los hongos previamente aislados, de 5 mm de diámetro en el centro de cada placa y se midió su crecimiento radial durante 9 días por el reverso de la placa. Se calculó el crecimiento en mm/día por triplicado. Las velocidades medias de crecimiento se calcularon como las pendientes de los datos ajustados a un modelo lineal.

Por otra parte, las curvas de crecimiento de los aislados bacterianos obtenidos a pH 3 se determinaron en base a la medición de proteínas totales, utilizando el método Bradford (1976). Para ello se inocularon los medios a pH 3, 5, 7 con cada aislado obtenido a pH 3. Se transfirieron 5 ml de cultivo cada 24 h para ser centrifugados por 15 min a 1750 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó a los tubos 500 µL de agua bidestilada y 500 µL de NaOH (0,5 M) y la suspensión se incubó a 100°C por 10 min. Se transfirieron 600 µL de la solución resultante a tubos de espectrofotómetro y posteriormente, se adicionó 2,4 mL de reactivo de Bradford a cada uno. Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 595 nm para cada muestra y se calculó la concentración de proteínas en los cultivos por comparación con una curva de calibración obtenida con BSA (1-10 µg/mL). La tasa de crecimiento específico (μ) se calculó para las primeras horas de crecimiento exponencial, en donde el comportamiento se describe por una línea recta cuya pendiente es μ .

2.6. Perfiles de TRFLP de bacterias y hongos de los microcosmos de suelo árido y semiárido a pH 3

Para la obtención de los perfiles de TRFLP, el DNA se obtuvo a partir de 0,25 gr de suelo de cada microcosmos luego del último recambio de medio, empleando el kit de extracción “Power Soil DNA isolation Kit” (MoBio Lab., Inc.). El DNA obtenido se resuspendió en 30 μ L de buffer TE. La concentración del DNA se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% como se describió anteriormente.

Posteriormente, la reacción de PCR se realizó con los partidores universales fD1-rP2 para bacterias e ITS1-ITS4 para hongos (Tabla 1). Las condiciones de amplificación y de verificación usadas son las mismas que las mencionadas en el punto 2.4 y 2.5 con la excepción de que los partidores fD1 e ITS1 se marcaron con el fluoróforo FAM (5-carboxifluoresceína) en el extremo 5’.

Los productos de PCR se digirieron con las enzimas *HaeIII* y *MspI* según las condiciones del fabricante (Fermentas). Para determinar los perfiles de TRFLP, los fragmentos terminales marcados producidos por la digestión enzimática se resolvieron en un secuenciador automático (Applied Biosystem Instruments; Macrogen).

El tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos terminales de restricción (TRFs), la altura y el área de los picos en los electroferogramas, se determinaron con el programa GeneMapper v3.0 (Applied Biosystems). Para el análisis se incluyeron sólo fragmentos mayores a 50 pb para descartar las señales de los partidores. Para normalizar y hacer comparables los electroferogramas de las distintas muestras se realizó un procedimiento iterativo para homogenizar las unidades de fluorescencia (UF) totales

(Dunbar y cols., 2001) y se eliminaron las señales con fluorescencia menor al 1% con respecto al total, las cuales podrían constituir ruido. Adicionalmente los perfiles se alinearon manualmente para evitar la identificación errónea de los TRFs por el corrimiento esperable en los tamaños de los fragmentos en la electroforesis capilar. Con los datos corregidos se determinó la fluorescencia relativa de los TRFs, éstos representan distintas unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y no necesariamente especies, por lo tanto, la fluorescencia de cada TRF se utilizó como un indicador de la abundancia relativa de los OTUs en cada muestra.

Finalmente, para comparar los resultados obtenidos mediante TRFLP con aquellos obtenidos por cultivo, se hizo una digestión *in silico* de las secuencias de los aislados obtenidos utilizando el programa Mega versión 4 (Tamura y cols., 2007). Para la identificación de los posibles filotipos presentes en la muestra se utilizó el programa de simulación MICA (<http://hermes.campus.udaho.edu>). Buscando coincidencias entre la base de datos y los fragmentos terminales obtenidos.

2.7. Genotecas bacteriana y fúngica del microcosmos de suelo árido a pH 3

Para poder determinar la composición bacteriana y fúngica de los suelos áridos tratados a pH 3 se construyó una genoteca bacteriana usando el marcador molecular rDNA 16S y una genoteca fúngica usando el marcador ITS. Para ello, 100 ng de los productos de PCR se purificaron mediante el kit de purificación “UltraClean PCR Clean-up” (MoBio Lab., Inc.). Los amplicones purificados se ligaron en el vector pTZ57R/T y se clonaron en células competentes de *Escherichia coli* XL1B mediante el kit de clonación “InsTAclone”

(Fermentas) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los transformantes se crecieron en medio LB (1,0% Triptona, 0,5% extracto de levadura, 1,0% NaCl, pH 7,0) y se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (50 µg/mL) y por su incapacidad de degradar el compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-galactopiranosido) en presencia de IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido). Para confirmar la presencia del inserto por PCR, los clones seleccionados se resuspendieron en 10 µL de buffer TE y el DNA se obtuvo por lisis celular mediante 8 ciclos sucesivos de choques térmicos de 1 min a 98°C y 1 min a 4°C, la amplificación se realizó utilizando los partidores M13F y M13R del vector.

En todos los clones positivos, el inserto amplificado fue digerido con la endonucleasa de restricción *Hae*III (Fermentas) para determinar el polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (patrón de RFLP). Posteriormente, todos los clones analizados se agruparon de acuerdo a su patrón de RFLP y un representante de cada patrón de RFLP fue secuenciado en un solo sentido con el partidor M13F del vector, utilizando un Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems; Macrogen Inc.). Los clones se guardaron en glicerol al 20% a -80°C (Sambrook y cols., 1989). Se consideró que todos los clones que comparten el mismo patrón de RFLP pertenecen al mismo OTU.

La identidad de las secuencias se evaluó utilizando el programa BLASTN (Altschul y cols., al 1997) por comparación con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank más relacionadas a las secuencias correspondientes a los clones obtenidos.

RESULTADOS

3.1. Montaje de los microcosmos y medición del pH

Los microcosmos se construyeron a partir de las muestras de suelo árido y semiárido, se trataron en forma independiente con medio salino a pH 3, 5 y 7 y se incubaron a 25°C con agitación. El tratamiento con medio a distintos pH se realizó con recambio de medio cada 2 días, como se describe en 2.1. El recambio de medio en una de las series de los microcosmos se realizó por decantación de la suspensión de suelo y recambio del sobrenadante por medio al pH correspondiente (serie 1 - decantados), mientras que para la otra serie de microcosmos, el sobrenadante fue reemplazado por medio al pH correspondiente, luego de la centrifugación de cada microcosmos (serie 2 - centrifugados). El pH de los microcosmos se midió mediante potenciometría al final de cada período de incubación (2 días), en el medio líquido extraído luego de dejar decantar o centrifugar cada microcosmos.

En los microcosmos de suelo semiárido, la variación de pH en ambas series de microcosmos fue muy similar. El pH del microcosmo al inicio del experimento fue cercano a 6,5 y se mantuvo los primeros tiempos de incubación cercano a ese valor, independiente del pH del medio adicionado a cada microcosmos. En tiempos posteriores, el pH del medio extraído fue disminuyendo en ambas series de microcosmos de manera similar, independiente también del pH del medio de cultivo adicionado, alcanzándose al final del período de incubación un pH entre 4 y 5 en todos los microcosmos, siendo ligeramente más ácidos los pHs medidos en los microcosmos decantados (Figura 2a y 2b).

En los microcosmos de suelo árido el pH inicial estuvo entre 7,7 y 7,9 y se mantuvo estable en el tiempo del ensayo en ambos microcosmos (centrifugado y decantado) tratados con medio a pH 5 y 7, mientras que en los tratamientos a pH 3 se observó una pequeña disminución hasta pH 7,4 en los microcosmos centrifugados y hasta pH 7,2 en los microcosmos decantados. (Figura 3a y 3b).

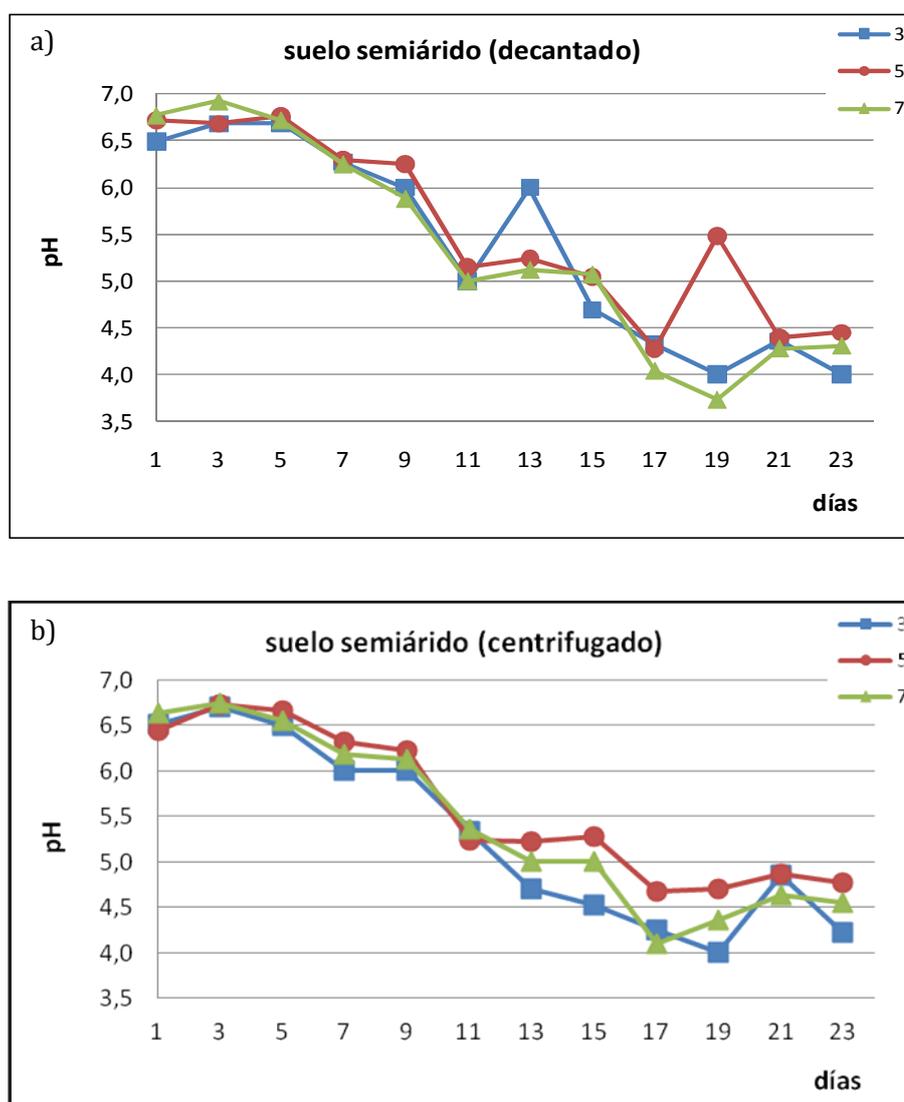


Figura 2. Variación del pH en los microcosmos de suelo semiárido tratados con medio a diferentes pHs (azul, medio a pH 3; rojo, medio a pH 5; verde, medio a pH 7); a) microcosmos decantados; b) microcosmos centrifugados.

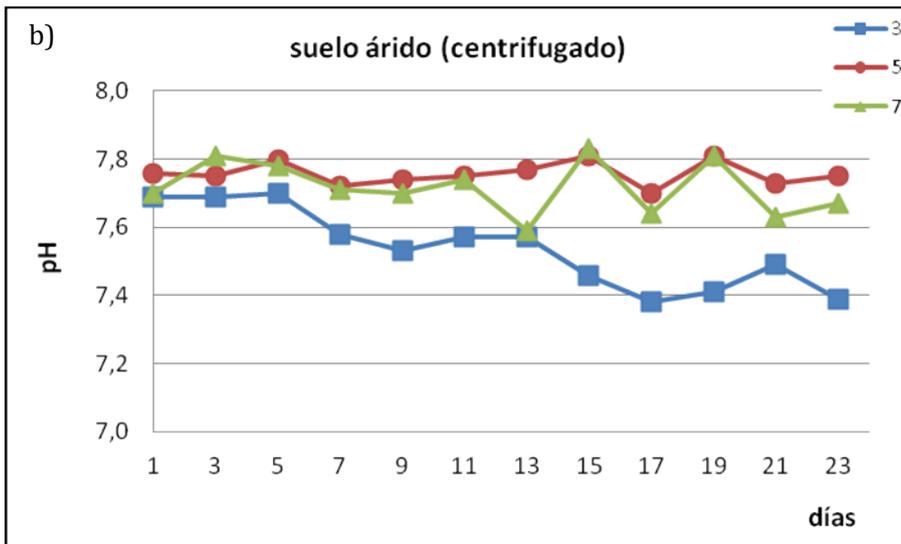
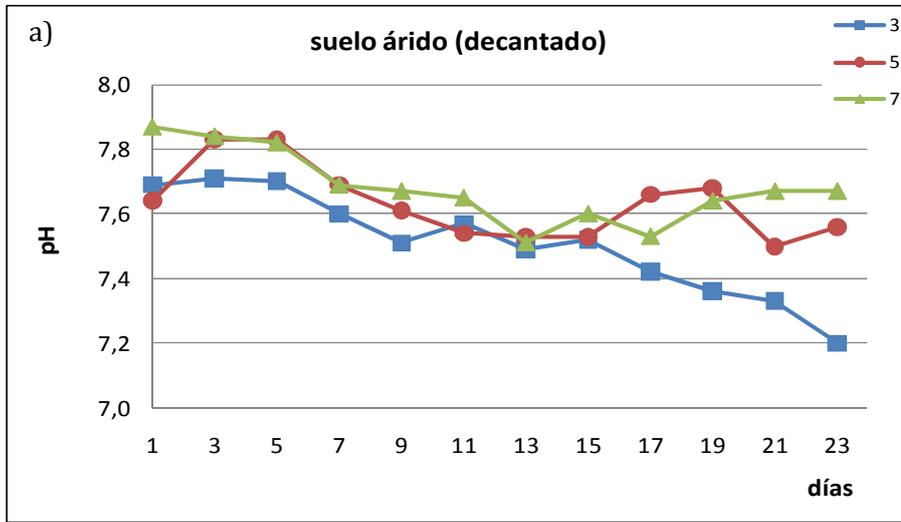


Figura 3. Variación del pH en los microcosmos de suelo árido tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7). a) microcosmos decantados. b) microcosmos centrifugados.

3.2. Recuento de unidades formadoras de colonia durante la incubación de los microcosmos

Las unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas y fúngicas se determinaron para los microcosmos de suelo árido y suelo semiárido, en cada uno de los tres tratamientos (pH 3, 5 y 7) y para cada tiempo en que se realizó el recambio de medio. Para esto se hicieron diluciones seriadas con el sobrenadante extraído a cada recambio. Los datos se muestran para los microcosmos centrifugados, en los cuales se recuperó mejor, tanto la fracción fúngica como la bacteriana.

En el recuento de UFC bacterianas desde microcosmos de suelos semiáridos (Figura 4a) se obtuvieron colonias a pH 3 sólo en los tiempos finales de tratamiento con medio ácido, por el contrario, en los microcosmos de suelos áridos (Figura 4b) se detectaron colonias a pH 3 solo en el inicio del tratamiento. Estas colonias correspondieron a morfotipos presentes en el suelo semiárido. A pH 7 se obtuvieron colonias bacterianas a lo largo del experimento en ambos tipos de suelos, estas colonias varían en abundancia, siendo mucho mayores los recuentos en el suelo árido al final del tratamiento. El recuento de colonias a pH 5 en ambos tipos de suelo es variable a lo largo del tratamiento, lo que sugiere que podría tratarse de grupos bacterianos distintos los cuales se hacen más abundante en algunos casos o se pierden durante el tratamiento.

Las UFC fúngicas a pH 3 se obtienen a lo largo de todo el tratamiento en ambos tipos de suelos y presentan menos variaciones en abundancia cuando se comparan con las colonias a pH 5 y pH 7. (Figura 5a y 5b)

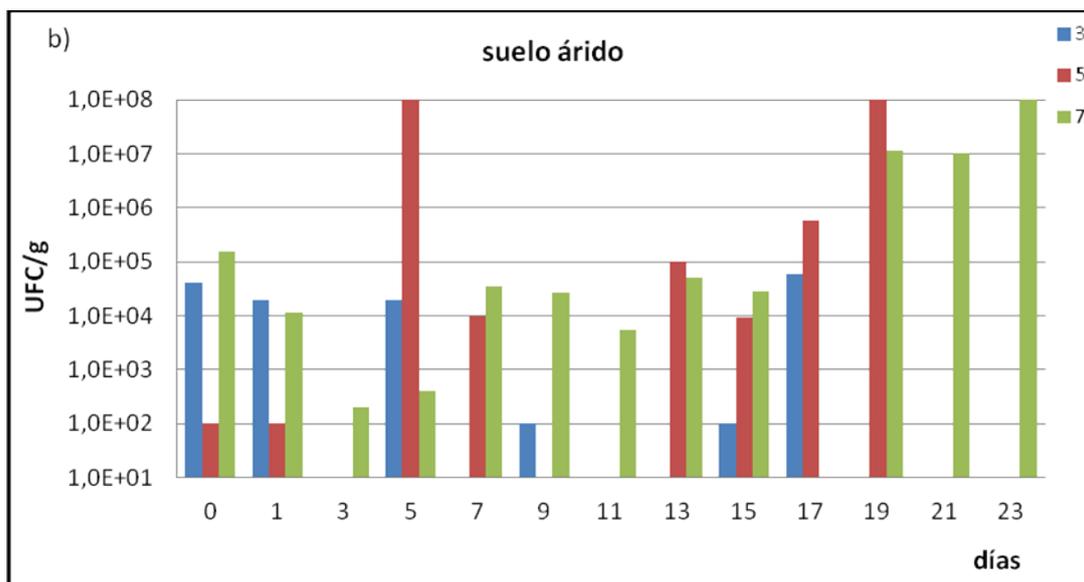
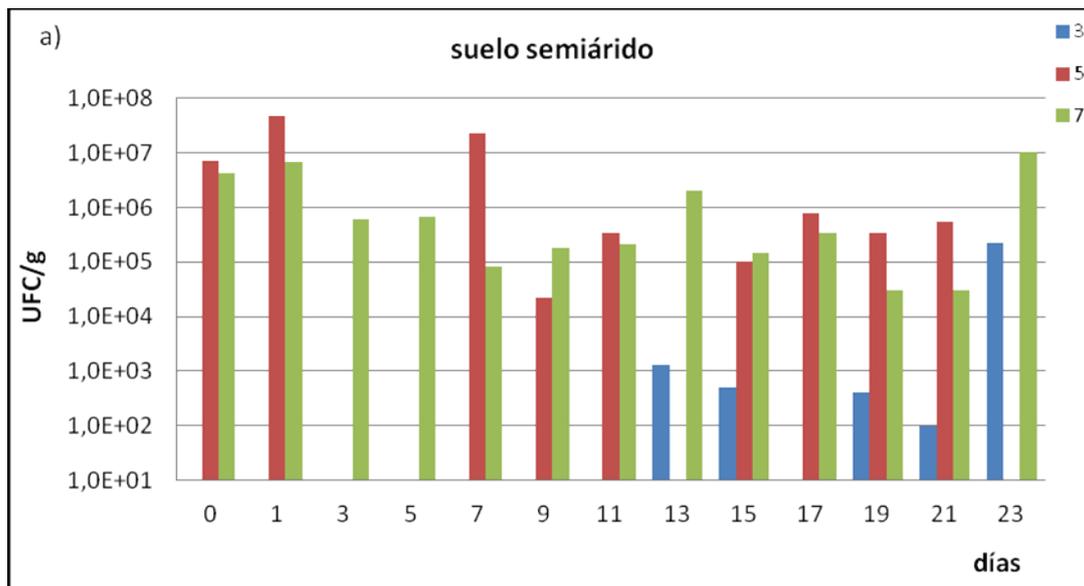


Figura 4. Unidades formadoras de colonia bacterianas totales por gramo de suelo obtenidas en los microcosmos tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7). a) microcosmos de suelos semiáridos. b) microcosmos de suelos áridos

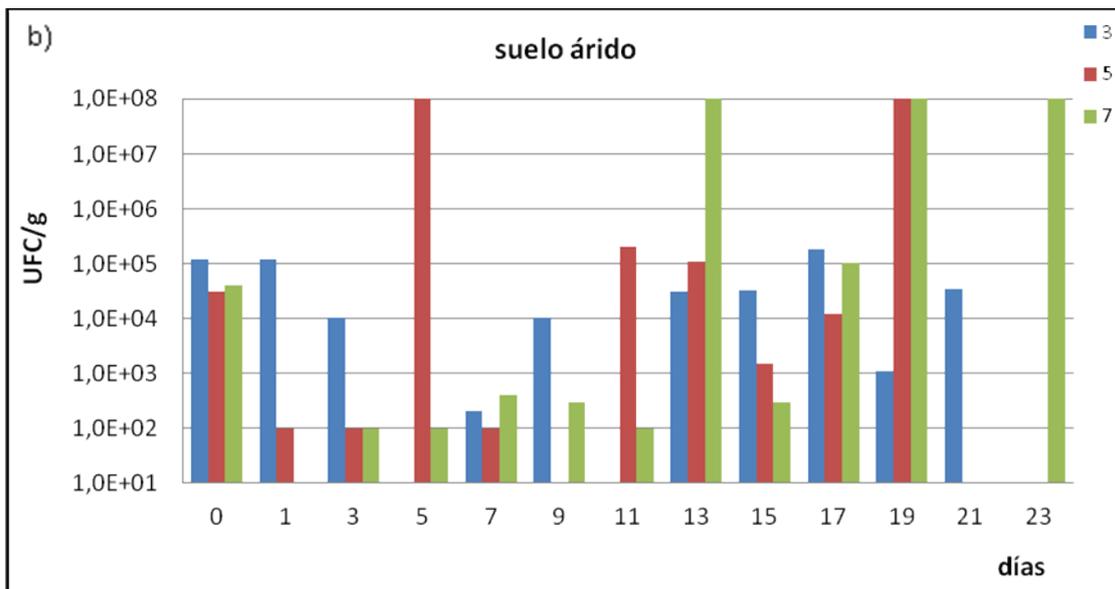
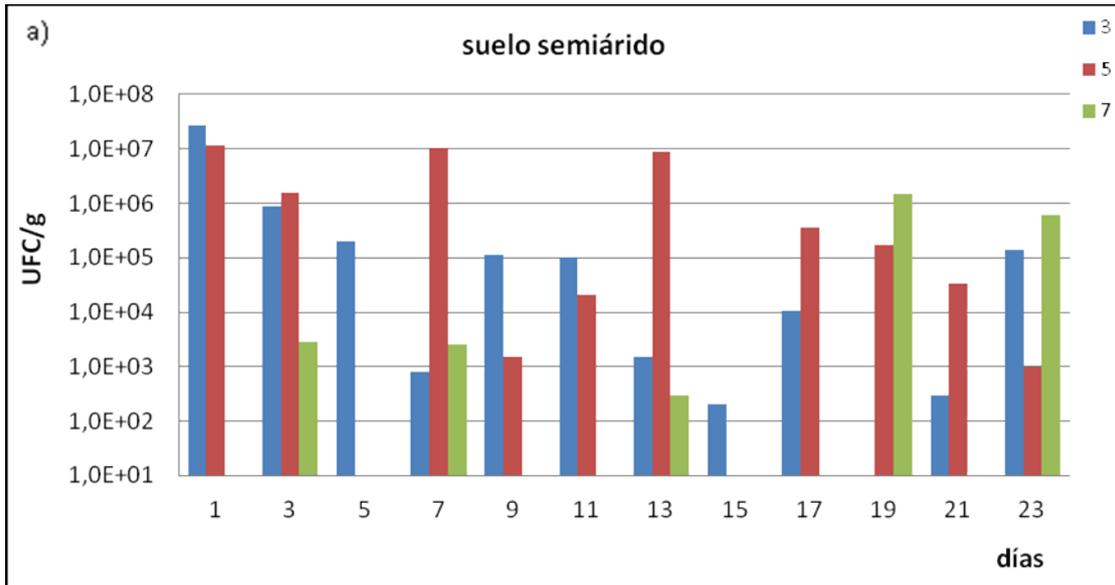
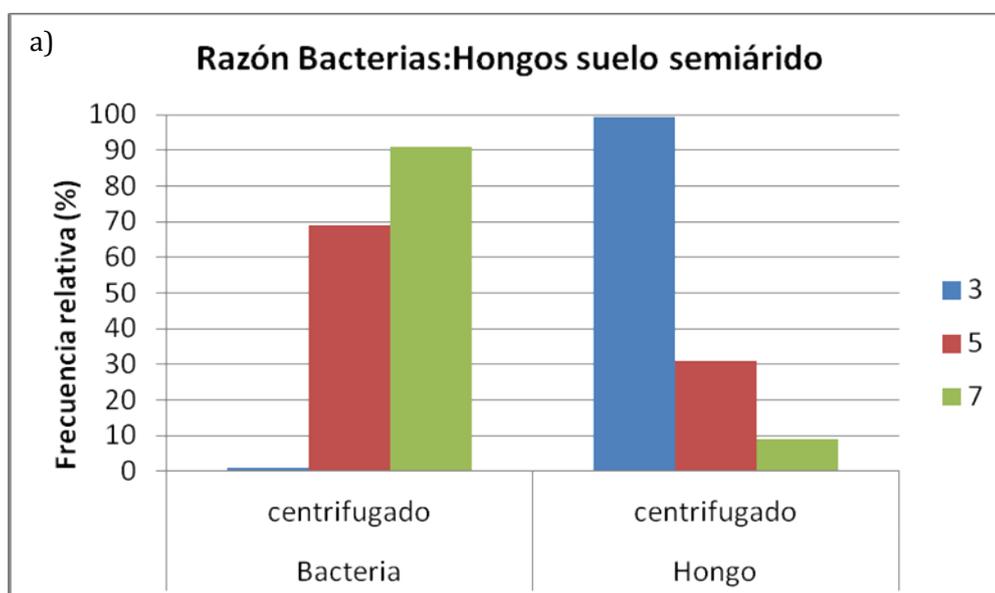


Figura 5. Unidades formadoras de colonia fúngicas totales por gramo de suelo obtenidas en los microcosmos tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7). a) microcosmos de suelos semiáridos. b) microcosmos de suelos áridos

Adicionalmente se comparó el número total de UFC de bacterias y hongos, obtenidos durante todo el experimento, en cada tipo de suelo de los microcosmos centrifugados. Para esta comparación, se seleccionó este microcosmos para el análisis porque es más representativo de la relación bacterias:hongos, ya que estos últimos generalmente no decantan fácilmente debido su estructura micelial. En las Figuras 6a y 6b, se muestra la frecuencia relativa de UFC en porcentaje de cada tipo microbiano donde se observa para el suelo semiárido que en todos los casos se recuperó una mayor proporción de UFC bacterianas, con excepción del microcosmos tratado con pH 3, donde las colonias fúngicas constituyen casi la totalidad de los aislados (Figura 6a). En el caso del suelo árido los hongos son predominantes con excepción de las colonias recuperadas a pH 5 donde se observa proporciones similares de bacterias y hongos (Figura 6b).



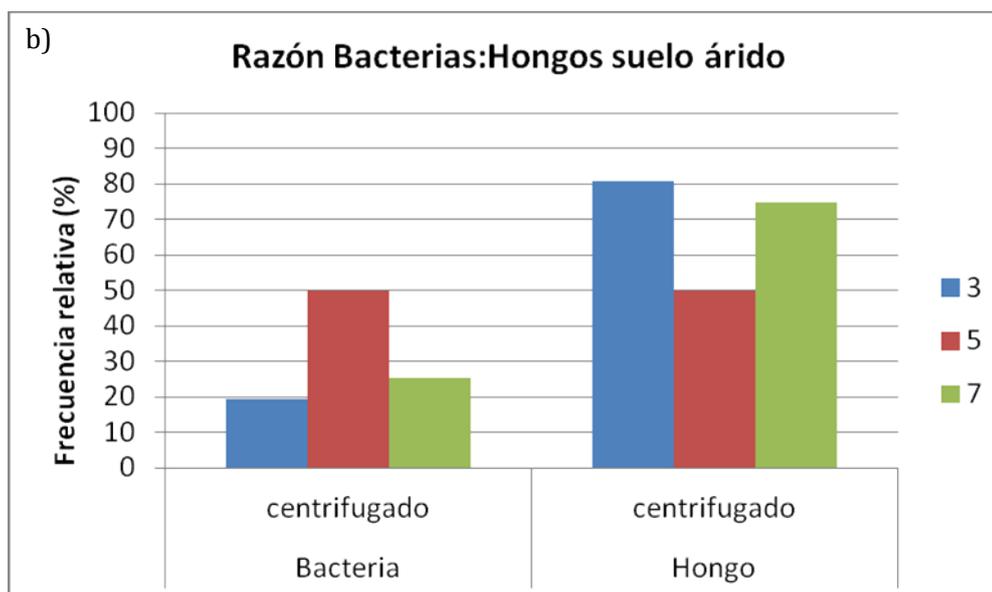


Figura 6. Relación bacterias:hongos en base al total de las unidades formadoras de colonia bacterianas y fúngicas obtenidas de los microcosmos tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7). a) microcosmos de suelo semiárido. b) microcosmos de suelo árido.

3.3 Aislamiento de colonias fúngicas y bacterianas desde los microcosmos tratados

A partir de los microcosmos tratados, a todos los tiempo de tratamientos, se obtuvieron aislados fúngicos y bacterianos que fueron agrupados según las características morfológicas de la colonia como son tamaño, forma, características del borde, elevación de la colonia y pigmentación, clasificándolos como distintos morfotipos, tanto fúngicos como bacterianos.

Desde el microcosmos de suelo semiárido, un total de 103 aislados bacterianos se obtuvieron a lo largo del tratamiento, que se distribuyeron de la siguiente manera un 8% se aislaron desde el tratamiento a pH 3, un 27% desde tratamiento a pH 5 y el 65% restante desde el tratamiento a pH 7. Desde los microcosmos de suelo árido, de los 32 aislados

obtenidos un 6% corresponde a pH 3, el 47% se obtuvo a pH 5 y el otro 47% a pH 7. Los aislados obtenidos a pH 3 en suelo árido corresponden solo aquellos obtenidos en los primeros tiempos de tratamiento y no fueron morfológicamente diferentes a los obtenidos a pH 3 en suelo semiárido. (Figura 7).

Del total de 142 aislados fúngicos obtenidos desde las muestras de suelo semiárido, un 26% provienen de los microcosmos tratados a pH 3, un 31% corresponde a hongos aislados desde pH 5 y un 43% desde el pH 7. Los hongos aislados desde microcosmos de suelo árido se distribuyeron en un 31% un 36% y un 33% en los tratamientos a pH 3, pH 5 y pH 7, respectivamente (Figura 7).

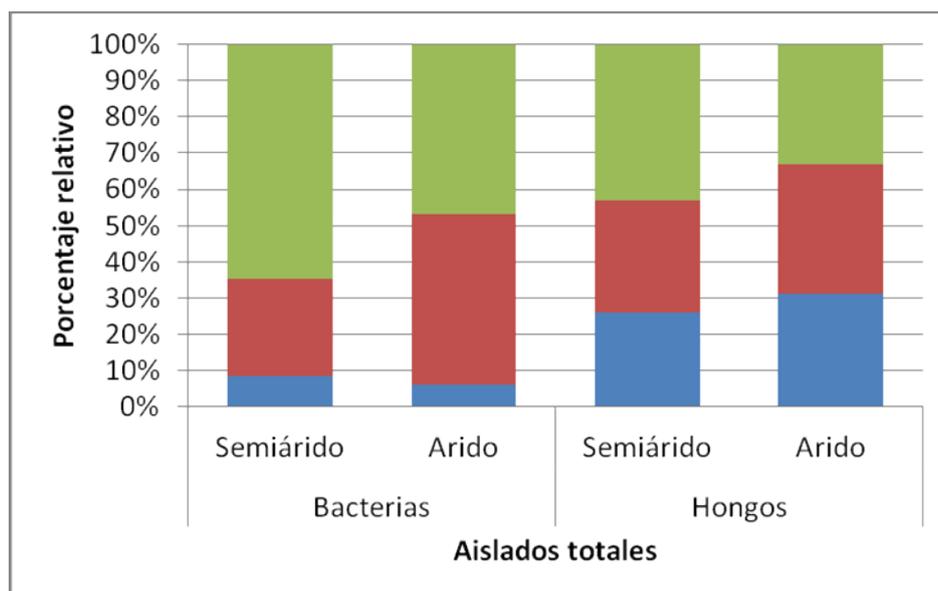


Figura 7. Porcentaje relativo de los aislados bacterianos y fúngicos totales obtenidos a lo largo de toda la incubación desde los microcosmos de suelo árido y semiárido, tratados con medio a diferentes pHs (azul, tratamiento a pH 3; rojo, tratamiento a pH 5; verde, tratamiento a pH 7).

3.4. Identificación de los aislados bacterianos y fúngicos obtenidos a pH 3

Para la identificación de los aislados obtenidos en el tratamiento a pH 3, un representante de cada uno de los morfotipos aislados en los tiempos finales de tratamiento de los microcosmos de suelo árido y semiárido fue identificado mediante secuenciación de marcadores moleculares específicos. Estos aislados corresponden a aquellos sometidos al tratamiento más drástico de acidificación y por lo tanto podrían ser más tolerantes a las condiciones ácidas. La identidad de las secuencias bacterianas obtenidas se evaluó utilizando el banco de datos NCBI y utilizando la herramienta BLASTN por comparación con las secuencias de los organismos cultivados más relacionados.

Al realizar la identificación de los diferentes morfotipos bacterianos obtenidos, todos los aislados se asociaron a *Rhodospirillum sp.* (Proteobacteria), (Tabla 2) independientemente de las diferencias morfológicas que presentaban entre ellos. La morfología de algunos aislados obtenidos se muestra en anexos.

Tabla 2. Identificación de los aislados bacterianos procedentes de los microcosmos de suelo semiárido tratados con medio a pH 3.

Aislado	Posición taxonómica de la secuencia más relacionada	Nº Acceso	% id	TRF* (<i>MspI/HaeIII</i>)		
Suelo semiárido	SB4	Proteobacteria, <i>Rhodospirillaceae</i> (<i>Rhodospirillum sp.</i>)	EU723176.1	99	89	38- 118
	SB5	Proteobacteria, <i>Rhodospirillaceae</i> (<i>Rhodospirillum sp.</i>)	EU723176.1	99	89	38- 118
	SB8	Proteobacteria, <i>Rhodospirillaceae</i> (<i>Rhodospirillum sp.</i>)	EU723176.1	99	89	38- 118
	SB13	Proteobacteria, <i>Rhodospirillaceae</i> (<i>Rhodospirillum sp.</i>)	EU881114.1	99	91	40- 120

SB16	Proteobacteria, <i>Rhodospirillaceae</i> (<i>Rhodospirillum sp.</i>)	EU723149.1	99	89	38- 118
------	---	------------	----	----	------------

*Se indican los fragmentos terminales de restricción (TRFs) obtenidos *in silico* con las enzimas de restricción *MspI* y *HaeIII*.

De los 24 aislados fúngicos obtenidos a pH 3 en los tiempos finales de tratamientos (19-23 días), 11 aislados se obtuvieron desde los microcosmos de suelo semiárido y 13 aislados desde los microcosmos de suelo árido. En anexos se muestran algunos de los morfotipos fúngicos. La comparación de las secuencias de los aislados fúngicos con la base de datos de NCBI indica que todos los morfotipos fúngicos obtenidos desde el suelo semiárido pertenecieron al grupo ascomycota, y sólo uno de los morfotipos aislado desde el suelo árido se asoció a los basidiomicotas (Tabla 3). Un 55% de los aislados fúngicos del suelo semiáridos se asociaron a la clase *Sordariomycetes*, un 18% a la clase *Eurotiomycetes*, un 9% a la clase *Dothideomycetes* y sólo dos aislados no se pudieron identificar. Desde el suelo árido la identificación permitió asociar un 31% a *Sordariomycetes*, un 23% a *Eurotiomycetes*, y un 23% a *Dothideomycetes* (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de los aislados fúngicos procedentes de los microcosmos de suelo semiárido y árido tratados con medio a pH 3.

Aislado	Posición taxonómica de la secuencia más relacionada	Nº Acceso	% id	TRF* (<i>MspI</i> / <i>HaeIII</i>)	
SH1	Ascomycota, <i>Sordariomycetes</i> (<i>Paecilomyces sp.</i>)	AB103380.1	100	39	41
SH4	Ascomycota, <i>Dothideomycetes</i> (<i>Preussia sp.</i>)	GU072584.1	86	28	398
SH5	Ascomycota, <i>Sordariomycetes</i> (<i>Paecilomyces sp.</i>)	AF548081.1	100	64	44
SH8	Ascomycetes, <i>Sordariomycetes</i>	GQ154626.1	100	47	68

Suelo semiárido

	<i>(Coniochaeta sp.)</i>					
	SH8-9	Ascomycota, <i>Sordariomycetes</i> (<i>Paecilomyces sp.</i>)	AF548081.1	99	41	47
	SH9	Ascomycota, <i>Sordariomycetes</i> (<i>Paecilomyces sp.</i>)	AY526475.2	99	42	63
	SH12	Ascomycota, <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Aspergillus sp.</i>)	HM473077.1	99	55	34
	SH14	-	-	-	-	-
	SH17	Ascomycota, <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Penicillium sp.</i>)	EU128638.1	99	23	37
	SH19	Ascomycetes, <i>Sordariomycetes</i> (<i>Coniochaeta sp.</i>)	GQ154626.1	99	56	41
	SH21	-	-	-	-	-
	AH9	Ascomycota, <i>Sordariomycetes</i> (<i>Fusarium sp.</i>)	GU361935.1	100	34	49
	AH58-1	Ascomycota, <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Exophiala sp.</i>)	FN298755.1	90	264	13
	AH58-2	Ascomycota, <i>Sordariomycetes</i> (<i>Cordyceps sp.</i>)	AB258368.1	92	55	43
	AH59-1	Ascomycota, <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium sp.</i>)	FJ025160.1	94	36	-
Suelo árido	AH59-2	Basidiomycota, <i>Ustilaginomycetes</i> (<i>Moesziomyces sp.</i>)	DQ831012.1	99	343	65
	AH74-1	Ascomycota, <i>Scytadilium</i>	FN812806.2	82	67	26
	AH79-1	Ascomycota, <i>Scytadilium</i>	AY762623.1	99	57	33
	AH123-1	Ascomycota, <i>Sordariomycetes</i> (<i>Paecilomyces sp.</i>)	AF548081.1	100	58	38
	AH124-1	Ascomycota, <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Talaromyces sp.</i>)	AY526473.2	100	59	39
	AH125-1	Ascomycota, <i>Eurotiomycetes</i> (<i>Chaetothyriales</i>)	EF638691.1	100	60	591

AH125-2	Ascomycota, <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium sp.</i>)	AJ300336.1	99	36	842
AH125-3	Ascomycota, <i>Dothideomycetes</i> (<i>Cladosporium sp.</i>)	FJ025160.1	94	35	-
AH125-4	Ascomycota, <i>Sordariomycetes</i> (<i>Cordyceps sp.</i>)	AB258368.1	96	72	56

*Se indican los fragmentos terminales de restricción (TRFs) obtenidos *in silico* con las enzimas de restricción *MspI* y *HaeIII*.

También se realizó una matriz de presencia ausencia para identificar si existía alguna relación entre los aislados identificados y el tratamiento aplicado al microcosmos decantado o centrifugado, encontrándose que para el caso de los hongos, en ambos suelos, se observa una mayor presencia en el tratamiento centrifugado, en el caso de los aislados bacterianos se encuentran presentes los aislados en ambos tratamientos (Tabla 4). Estos datos indican que el diseño experimental donde los microcosmos son sometidos a centrifugación fue más representativo de la microbiota que aquellos sometidos a decantación. Esta diferencia podría estar dada por diferencias en la decantación de los microorganismos, en particular los hongos, ya que debido a su estructura micelial tienden a mantenerse en suspensión y son difíciles de decantar, por lo tanto los microcosmos centrifugados sedimentan el total de los microorganismos y resultan más representativos de la microbiota presente.

Tabla 4. Matriz de presencia ausencia de los aislados según el tratamiento del microcosmos a) bacterianos de suelo árido b) fúngicos de suelo semiárido y c) fúngicos de suelo árido

a) aislado	centrifugado	decantado
SB4	P	P
SB5	P	P
SB8	P	P

SB13	P	P
SB16	P	P

b) aislado	centrifugado	decantado
SH1	P	P
SH4	P	A
SH5	P	P
SH8	P	P
SH8.9	P	P
SH9	P	A
SH12	P	A
SH14	P	P
SH17	P	P
SH19	P	P
SH21	P	P

c) aislado	centrifugado	decantado
AH9	P	A
AH58.1	P	A
AH58.2	P	A
AH59.1	A	P
AH59.2	A	P
AH74.1	P	A
AH79.1	P	P
AH123.1	P	P
AH124.1	P	P
AH125.1	P	A
AH125.2	P	A
AH125.3	P	A
AH125.4	P	A

3.5. Determinación de las tasas de crecimiento específicas de los aislados bacterianos y las velocidades de crecimiento radial de los aislados fúngicos obtenidos a pH 3

A cada uno de los aislados identificados, que representan los distintos morfotipos bacterianos y fúngicos obtenidos a pH 3, se les determinó su curva de crecimiento a partir

de la cual se calculó la tasa de crecimiento específico para el caso de los cultivos bacteriano y la velocidad de crecimiento radial en el caso de los hongos. A pesar que todos los representantes bacterianos se asociaron a la misma secuencia en la base de datos, las tasas de crecimiento específico calculadas son distintas. Mientras que los aislados SB4 y SB16 presentaron la mayor tasa de crecimiento específico a pH 5 comparado con la tasa de crecimiento a los otros dos pH, los aislados SB8 y SB13 presentaron la mayor tasa de crecimiento específico a pH 7 y el aislado SB5 presentó igual tasas de crecimiento a todos los pHs ensayados (Figura 8). Ninguno de los aislados bacterianos presentó mayor tasa de crecimiento a pH 3, indicando que son tolerantes a las condiciones ácidas, pero que no se trata de bacterias acidófilas ya que el mayor crecimiento se obtuvo a pH más altos.

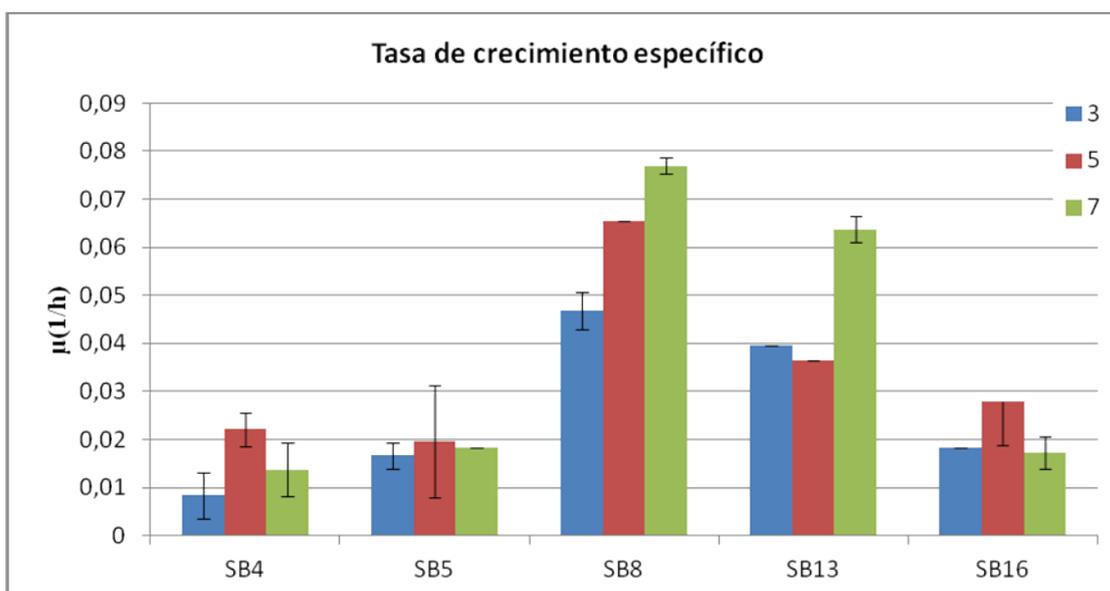


Figura 8. Tasa de crecimiento específico (μ) de los aislados bacterianos obtenidos desde los microcosmos de suelo semiárido cultivados a diferentes pHs (azul, medio a pH 3; rojo, medio a pH 5; verde, medio a pH 7).

En el caso de los hongos, los resultados de las velocidades de crecimiento radial promedio indican que la mayoría de los hongos aislados desde el suelo semiárido crecen

más lento que los hongos aislados desde el suelo árido (Figuras 9 y 10). En el suelo semiárido la mayoría de los aislados presentan mayores velocidades de crecimiento a medida que el pH aumenta lo que se observa más claramente para SH19. Sin embargo, hay aislados que crecen mejor a pH 5 como ocurre con SH1; mientras que SH14 crece mejor a pH 3. Llama la atención el crecimiento del aislado SH17 que presenta mayor crecimiento a pH3 y pH7, pero menor crecimiento a pH5 (Figura 9). Para los aislados obtenidos de los microcosmos de suelo árido, 3 de ellos alcanzaron la mayor velocidad de crecimiento a pH 3, AH58-1, AH124-1 y AH125-4. El aislado AH124-1 se identificó como perteneciente al género *Talaromyces*, el aislado AH125-4 al género *Cordyceps* y el aislado A58-1 al género *Exophiala* (Figura 10).

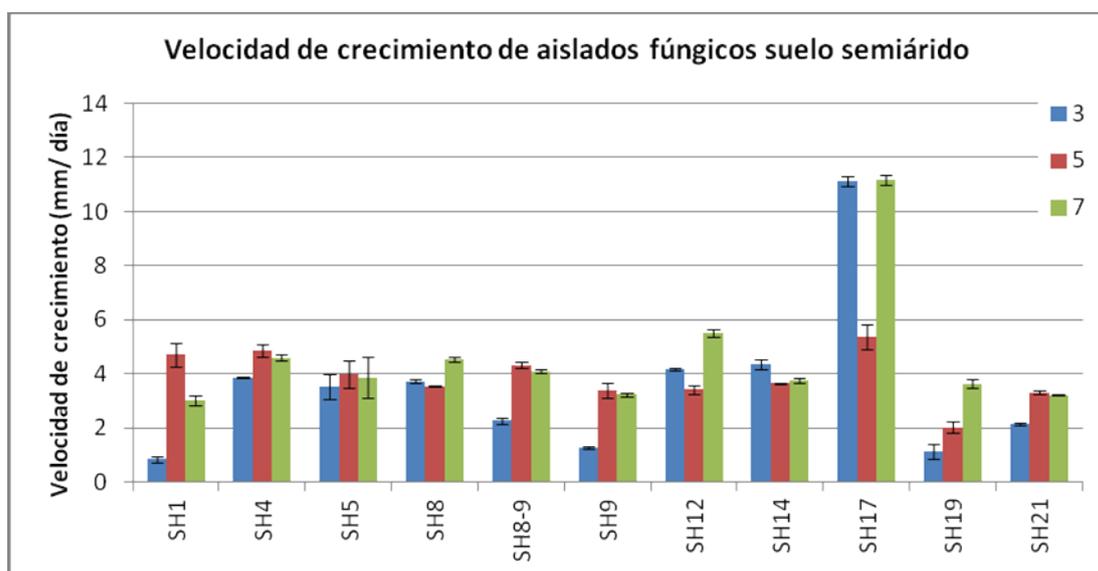


Figura 9. Velocidad de crecimiento radial promedio de los aislados fúngicos obtenidos desde los microcosmos de suelo semiárido cultivados a diferentes pHs (azul, medio a 3; rojo, medio a pH 5; verde, medio a pH 7).

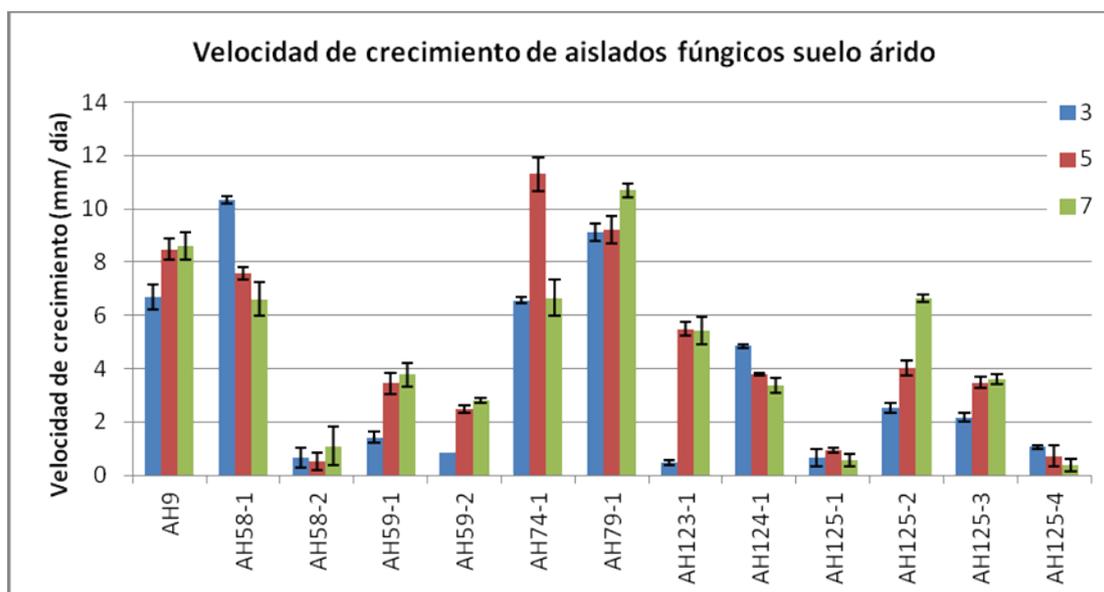


Figura 10. Velocidad de crecimiento radial promedio de los aislados fúngicos obtenidos desde los microcosmos de suelo árido cultivados a diferentes pHs (azul, medio a pH 3; rojo, medio a pH 5; verde, medio a pH 7).

3.6. Perfiles de TRFLP de bacterias y hongos de los microcosmos de suelos árido y semiárido a pH 3

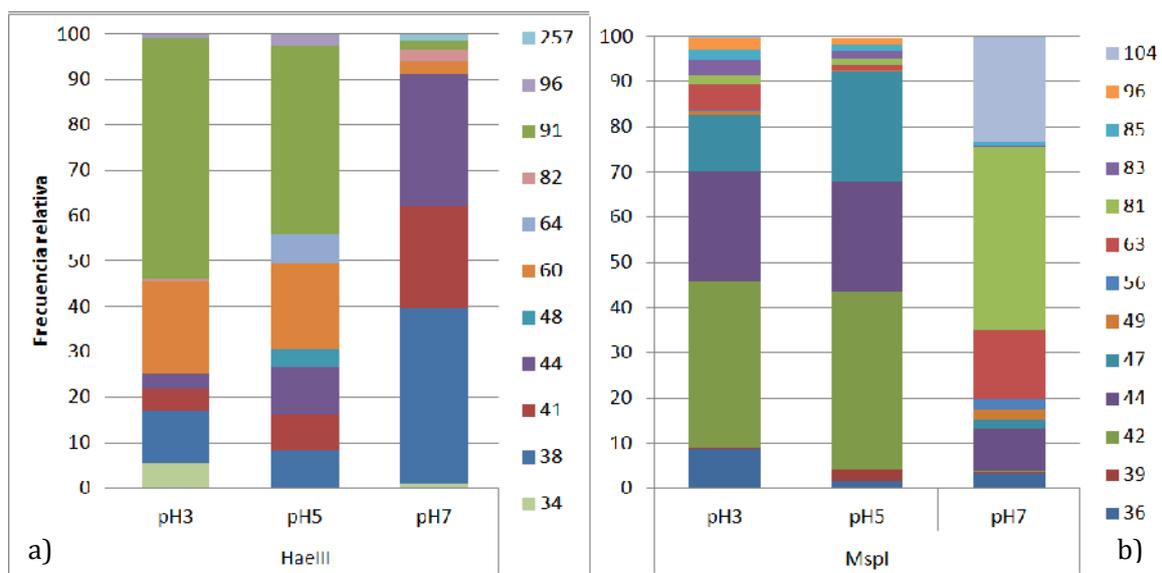
El efecto de la acidificación de los suelos, en forma crónica en un corto plazo, sobre la estructura genética de la microbiota se determinó mediante perfiles de TRFLP de la comunidad microbiana de cada microcosmos a cada pH. Para ello el DNA se obtuvo directamente de las muestras de suelo, se amplificaron los marcadores moleculares específicos para bacterias y hongos utilizando partidores marcados con un fluoróforo, y se digirieron los amplicones purificados con las enzimas *HaeIII* y *MspI*. La riqueza de filotipos en cada muestra se obtuvo a partir del número de fragmentos terminales de restricción o TRF (que se caracterizan por su tamaño en bp) y una medida de la abundancia de cada filotipo se obtuvo de las unidades de fluorescencia de cada TRF.

Los perfiles de TRFLP bacterianos obtenidos con el marcador molecular rDNA 16S se analizaron para ambos tipos de suelos a los distintos pH al final de la incubación. Los perfiles de TRFLP se obtuvieron mediante el tratamiento independiente de los amplicones con dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *MspI*). La frecuencia relativa de los principales TRFs se muestra en la Figura 11a y 11b para el suelo semiárido y en la Figura 12a y 12b para el suelo árido. Los perfiles de TRFLP para el marcador rDNA 16S obtenidos mediante la digestión con las dos enzimas de restricción muestran que la estructura de la comunidad bacteriana de suelos semiáridos (Figura 11a y 11b) son más parecidas entre los pH 3 y pH 5, sin embargo a pH 7 el perfil de T-RFLP muestra la presencia de distintos filotipos indicando que la estructura de la comunidad es diferente. Por otra parte, cuando se comparan los TRFs de los aislados bacterianos (Tabla 2) obtenidos “*in silico*” con los TRFs experimentales obtenidos para el microcosmos de suelo semiáridos se puede concluir que *Rhodospirillum* sp. podría estar representado por el fragmento de restricción terminal de 38 bp en la digestión con *HaeIII* (Fig 11a) y por el fragmento de 85 bp en la digestión con *MspI* (Fig 11b). De acuerdo a estas comparaciones *Rhodospirillum* también estaría presente en el suelo semiárido tratado a los otros dos pH.

En los perfiles de los microcosmos del suelo árido (Figura 12a y 12b) se obtuvieron menos TRFs que en los del suelo semiárido, siendo los perfiles más diferentes los provenientes de los microcosmos tratados con pH 5, donde se encuentran mayor diversidad de TRFs o filotipos.

También se determinó la estructura de la comunidad fúngica presente en estos microcosmos a partir de perfiles TRFLP obtenidos con el marcador molecular ITS, utilizando dos enzimas de restricción. La frecuencia relativa de los principales TRFs se

muestra en la Figura 13a y 13b para el suelo semiárido y para el suelo árido en la Figura 14a y 14b. Los perfiles de TRFLP muestran que para los 3 pHs el número y tipo de TRFs se mantienen, esta observación es especialmente evidente en el patrón de TRFLP de suelo semiárido tratado con *HaeIII* (Fig 13a). Para los suelos semiáridos el tratamiento con *MspI* resultó más resolutivo, hay mayor número de TRFs, los cuales están en su mayoría presentes en los perfiles a pH 3, 5 y 7, una excepción es la ausencia del TRFs de 652 pb en el suelo tratado a pH 5. Para el caso de los patrones TRFLP de suelo árido tratados con *HaeIII*, (Fig 14a), los filotipos fúngicos también se comparten con la excepción del TRF de 45 pb que solo se encuentra presente a pH 3, aunque en general los patrones fúngicos resultaron poco diversos con ambas enzimas.



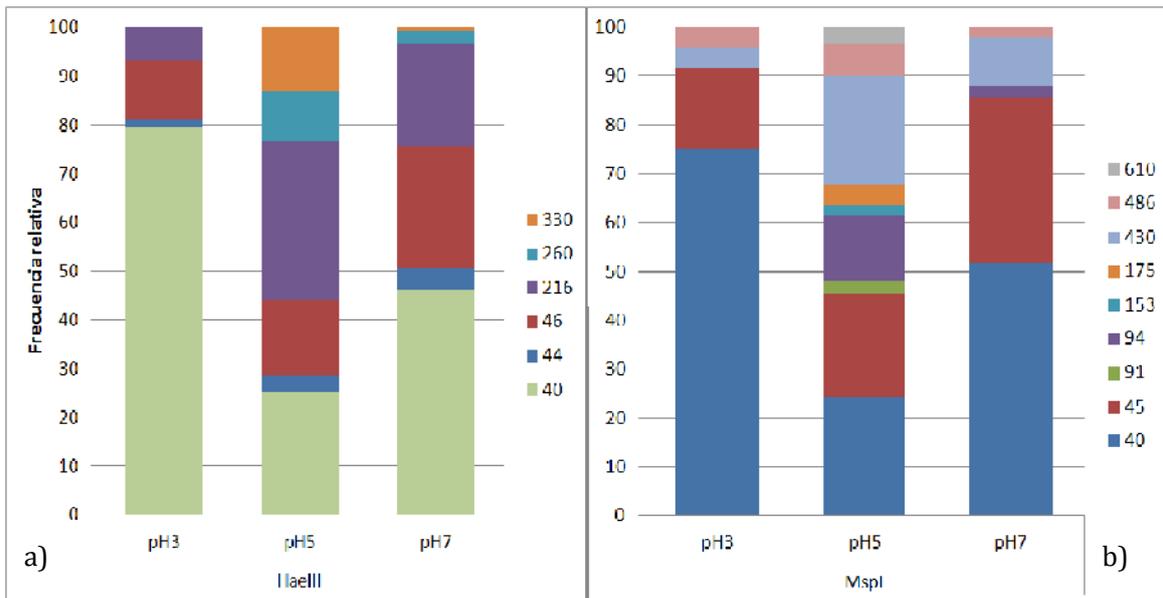


Figura 12. Frecuencia relativa de los fragmentos terminales de restricción de la comunidad bacteriana en los microcosmos (centrifugado) de suelo árido tratados con medio a diferentes pHs (3, 5, 7). a) enzima de restricción *HaeIII*. b) enzima de restricción *MspI*.

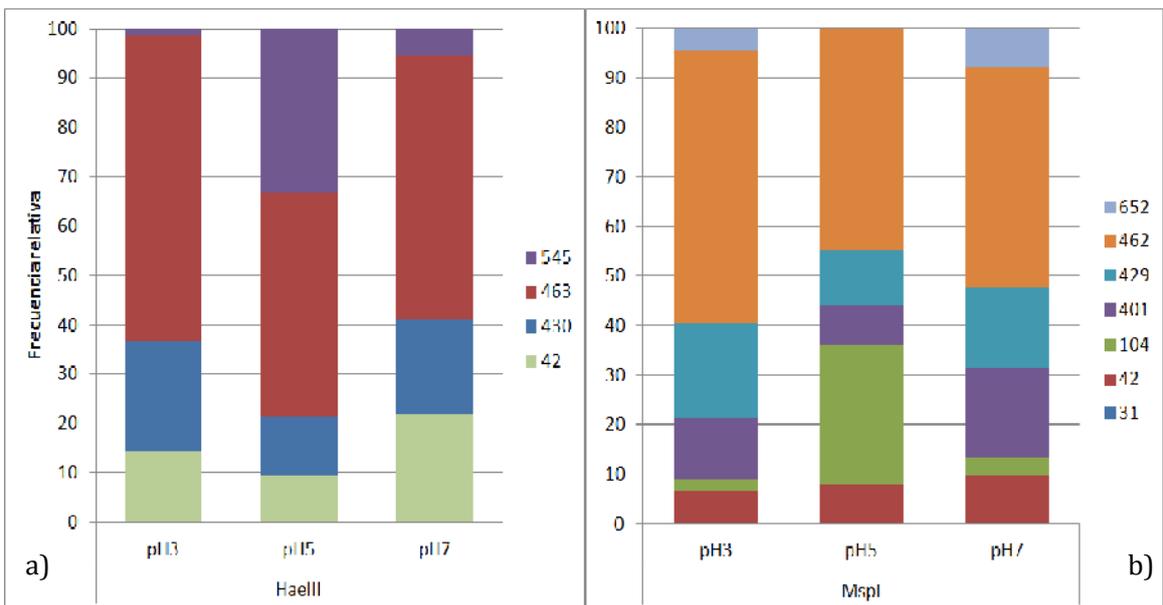


Figura 13. Fragmentos terminales de restricción de la comunidad fúngica en los microcosmos (centrifugado) de suelo semiárido tratados con medio a diferentes pHs (3, 5, 7). a) enzima de restricción *HaeIII*. b) enzima de restricción *MspI*.

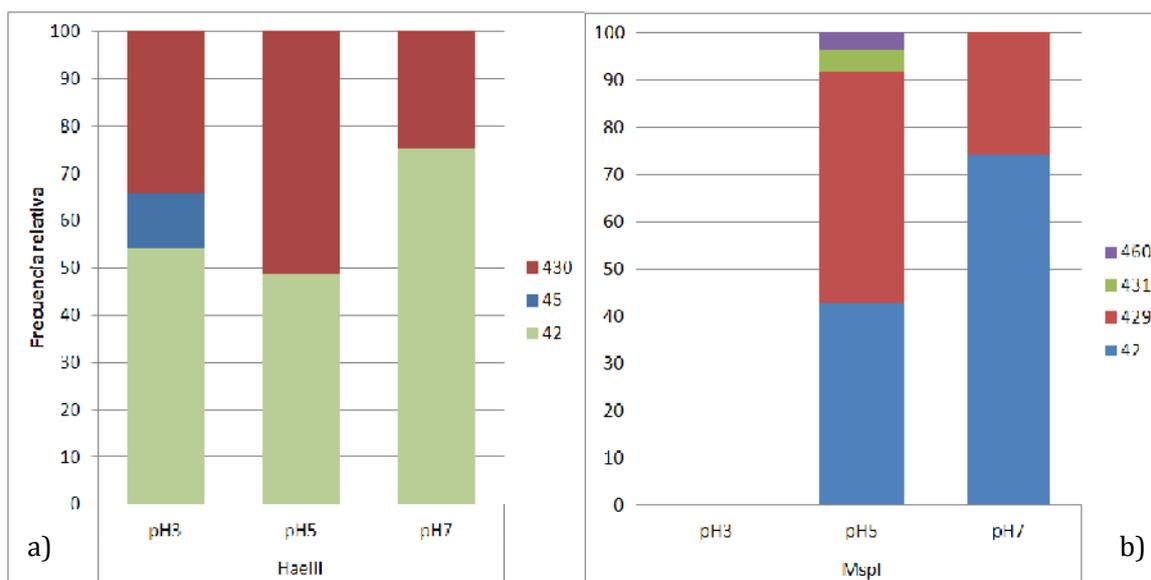


Figura 14. Fragmentos terminales de restricción de la comunidad fúngica en los microcosmos (centrifugado) de suelo árido tratados con medio a diferentes pHs (3, 5, 7). a) enzima de restricción *HaeIII*. b) enzima de restricción *MspI*.

3.7. Genotecas bacteriana y fúngica del microcosmos de suelo árido a pH 3

Existen antecedentes de que los suelos áridos presentan una mayor diversidad microbiana que los suelos semiáridos. Sin embargo, en este estudio no se obtuvieron aislados bacterianos a pH 3 en los microcosmos de suelos áridos en los tiempos finales de tratamiento, esto sugiere que podría haber una fracción bacteriana, la cual no fue detectada bajo las condiciones de aislamiento ensayadas. Sin embargo, cuando se determinaron los perfiles de T-RFLP se muestra que hay una fracción bacteriana (genes bacterianos amplificables) presente en la muestras de suelos áridos a pH 3, lo que indicaría que se trata de una fracción bacteriana no cultivable bajo las condiciones usadas en este estudio. Por lo tanto resulta de interés determinar la composición de la comunidad microbiana total tanto bacteriana como fúngica de los microcosmos de suelo áridos tratados a pH 3. Para ello se

construyó una genoteca con marcadores específicos para cada grupo microbiano, a partir de las muestras del último tiempo de incubación de los microcosmos. Para ello se purificó el DNA de los microcosmos de suelo árido a pH 3 y se amplificó el DNA correspondiente a los genes ribosomales 16S para la construcción de la genoteca bacteriana y la región ITS para construir la genoteca fúngica. Los fragmentos amplificados se clonaron y en los clones positivos el inserto se reamplificó con los partidores del vector de clonación. Los insertos se caracterizaron mediante RFLP. Clones con igual patrón de RFLP se agruparon y un representante de cada grupo fue secuenciado. Se caracterizaron aproximadamente 100 clones por genoteca y se secuenciaron un total de 40 clones bacterianos correspondiente a los representantes de grupo de RFLP y 22 clones fúngicos correspondiente a los grupos de RFLP.

La figura 15 muestra la distribución de los clones en los principales grupos bacterianos. A nivel de la composición bacteriana, en los microcosmos de suelos áridos tratados a pH 3, las Proteobacterias aparecen como el grupo predominante reuniendo al 37,5% de los clones analizados, seguido por las Actinobacterias que representan el 17,5% y con igual porcentaje aparecen los Firmicutes. Cuando se compara la composición de la microbiota de los microcosmos de suelo áridos sometido a una acidificación crónica, con la composición de la microbiota bacterianas del mismo suelo sin acidificación (Espinosa 2010) se observan importantes cambios en la composición bacteriana. Por ejemplo, en la genoteca a pH neutro las actinobacterias son el grupo predominante (34,3%) seguido de Firmicutes (16,2%) (Espinosa 2010). Por su parte, las Proteobacterias en el suelo árido a pH 7 sólo representa el 12,4%, indicando que el tratamiento con ácido favoreció en 3 veces la abundancia relativa de este grupo en los microcosmos de suelos áridos perturbados a pH

3 alcanzando un 37,5%. Notablemente, el grupo Nitrospirae representa un 17,5% en esta genoteca a pH 3 (Figura 15), mientras que en condiciones neutras este grupo representa solo un 1,0% (Espinosa 2010). Otra observación relevante es que el grupo Bacteroidetes no se detecta a pH3 en comparación con el 15% de abundancia relativa que se obtiene a pH 7.

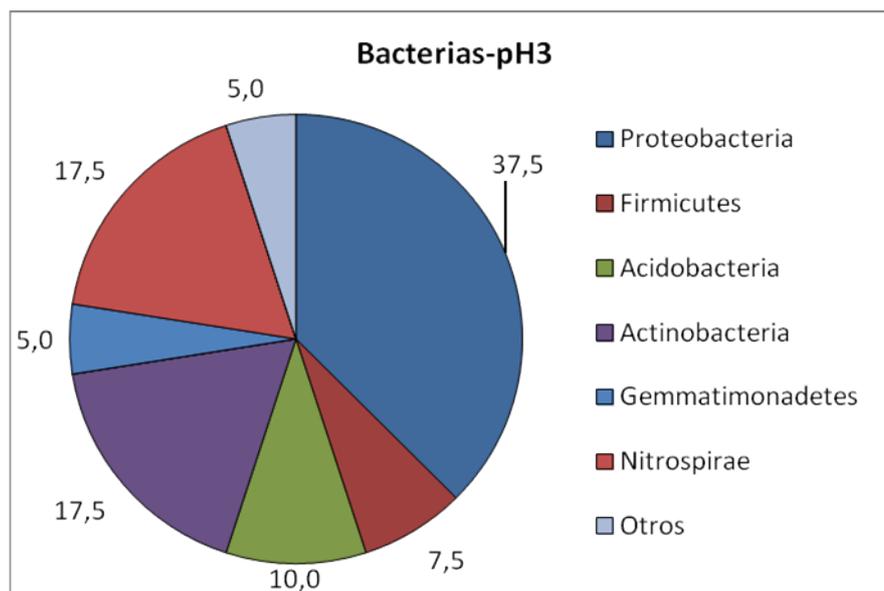


Figura 15. Abundancia relativa (%) de los diferentes grupos taxonómicos bacterianos basados en las secuencias de los clones del gen del rRNA 16S obtenido desde los microcosmos del suelo árido tratado con medio a pH 3.

En la Figura 16 se muestra la composición de la genoteca fúngica obtenida desde los microcosmos de suelos áridos tratados a pH 3. Cuando se compara la composición de las genotecas fúngicas obtenidas de los microcosmos de suelos áridos que fueron acidificados, con la genoteca del mismo suelo no perturbado descrita por Farias (2011), se observa que en ambas el grupo más abundante son los Ascomycota. Los grupos Dothideomycetes y Eurotiomycetes son predominantes en ambas genotecas, representando en conjunto casi el 75% de los clones. Estos datos muestran que la comunidad fúngica es

más resistente al cambio que la comunidad bacteriana. Sin embargo, se detectaron diferencias entre las genotecas, por ejemplo en la genoteca a pH 3 no se obtuvieron clones pertenecientes a los Pezizomycetes, los cuales son el segundo grupo más importante en la genoteca a pH 7 con una abundancia relativa de un 18% (Farias 2011). Asimismo, la disminución de pH produciría un aumento en la abundancia relativa de grupos fúngicos minoritarios como los Leotiomyces, Saccharomyces y Sordariomyces, (Figura 16) los cuales no se detectan en la genoteca a pH 7 (Farias 2011)

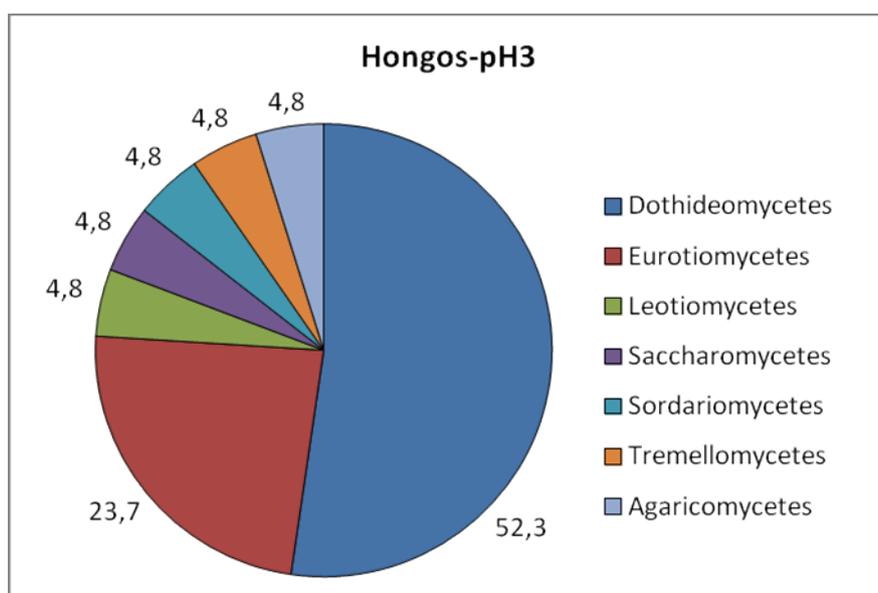


Figura 16. Abundancia relativa (%) de los diferentes grupos taxonómicos fúngicos, a nivel de clase, basados en secuencias de los clones de la región ribosomal intergénica (ITS) obtenidos del microcosmos de suelo árido tratado con medio a pH 3.

DISCUSION

En general hay escasa información sobre la diversidad genética de la microbiota de ecosistemas áridos o semiáridos porque se considera que en estos ecosistemas hay reducida actividad microbiana como consecuencia del bajo contenido hídrico (Otter & Scholes 2005). Sin embargo, estos ambientes más extremos pueden albergar una gran diversidad de microorganismos (Bhatnagar & Bhatnagar 2005) que constituyen una fuente de recurso genético cuyas propiedades metabólicas les permiten resistir o tolerar condiciones de estrés hídrico, acidificación de los suelos, limitación de nutrientes, entre otras (Chanal y cols., 2006; Rainey y cols., 2005). Por lo tanto, estas comunidades microbianas podrían responder de manera diferente a las perturbaciones ambientales como el aumento del contenido hídrico o la disminución de pH, ya sea modificando su actividad así como la composición de filotipos bacterianos o fúngicos de la comunidad microbiana. Esta tesis corresponde a un estudio orientado a evaluar el efecto de la acidificación de microcosmos de suelos áridos y semiáridos sobre la diversidad de la microbiota bacteriana y fúngica.

Microcosmos de suelos áridos y semiáridos a distintos pH

Una forma de evaluar estas perturbaciones sobre la microbiota del suelo es a través del estudio de microcosmos. Los microcosmos son sistemas controlados y reproducibles que intentan simular los procesos e interacciones de componentes en una porción del ambiente terrestre (Gillett & Witt, 1980). Aunque el uso de microcosmos, como herramienta para estudiar procesos ecosistémicos, ha sido criticado por estar temporalmente limitados y no reflejar las complejas relaciones entre especies que tienen lugar en el medio

natural (Gillett & Witt 1980), este argumento en general no se aplica a los microorganismos donde las escalas temporales y espaciales son mucho más reducidas (Prosser y cols., 2003) y por tanto esta aproximación resulta útil (Gillett ,1989) para responder interrogantes como las planteadas en esta tesis. Es por esto que se propuso estudiar el efecto del pH utilizando un ensayo de microcosmos.

El pH del suelo se puede modificar por diferentes causas, la acidificación de estos es un proceso dinámico que engloba la acción de factores naturales y antropogénicos, entre estos últimos está el caso de la precipitación ácida (Querol y cols., 2001). Así también, en suelos donde hay extracción de minerales, el pH se modifica notablemente por el fenómeno conocido como drenaje ácido de mina (Haferburg & Kothe 2007). Por otro lado, el pH es considerado a nivel global un buen descriptor de la diversidad y riqueza de ensamblajes microbianos, siendo los suelos con pH neutro los más diversos y disminuyendo la diversidad con el aumento de la acidez (Fierer & Jackson 2006). De acuerdo a esto, el estudio de esta tesis propone que disminuciones del pH de los microcosmos de suelo tendría efectos en la estructura comunitaria estudiada mediante los patrones de T-RFLP y en la diversidad de filotipos observados en la genoteca de clones obtenidos a pH 3.

En este trabajo, se sometieron microcosmos de suelos áridos y semiáridos a tratamientos a pH 3, 5 y 7. Las mediciones de pH durante los tratamientos muestran que estos suelos se comportan de manera distinta. En los microcosmos de suelo semiárido se observa una importante reducción del pH al final del experimento alcanzando valores entre 4,3-4,5 unidades de pH en promedio, independiente del tratamiento aplicado. Este comportamiento de los microcosmos de suelo semiárido, podría ser consecuencia de la acumulación de ácidos orgánicos por una mayor actividad y abundancia microbiana en

estos suelos comparados con los suelos áridos (Orlando 2008). Otra fuente de acidez en los suelos semiáridos usados en este estudio, es el mayor contenido de materia orgánica de aproximadamente un 6% (Farias y cols 2009) comparado con el 0,2% de materia orgánica presente en los suelos áridos (Orlando et al 2010), que favorece la actividad microbiana en los suelos semiáridos. Además, el humus posee grupos activos que se comportan como ácidos débiles liberando iones hidrógeno y la descomposición de residuos orgánicos produce CO_2 , el cual se combina con agua para formar ácido carbónico, que también favorecería la disminución de pH en los microcosmos de suelos semiáridos. Por otra parte, en los microcosmos de suelos áridos el pH se reduce menos de una unidad para todos los tratamientos, aunque un ligero efecto de acidificación se observa en el microcosmo a pH3 en los tiempos finales del tratamiento. El diferente comportamiento de estos suelos es probablemente debido, a que posee mayor concentración de sales por lo tanto actúa amortiguando el pH ácido. Los suelos áridos en general presentan menos abundancia microbiana que los suelos semiáridos y una escasa cantidad de materia orgánica, lo cual limitaría el crecimiento microbiana reduciendo la producción de ácidos.

La variación de UFC/g obtenidas para ambos suelos no muestra una tendencia clara con respecto a la disminución de estas en relación al pH, sin embargo, si se observan fluctuaciones en las UFC/g bacterianas obtenidas a pH 3 pudiendo significar que las poblaciones de bacterias tolerantes al pH 3 sufren cambios en su abundancia, durante el tratamiento. Con respecto a las colonias fúngicas si bien ocurren cambios en su abundancia, estos son similares en los distintos pHs ensayados lo que estaría de acuerdo con lo obtenido por Rousk 2010, en donde se observó una menor dependencia de las comunidades fúngicas con respecto al pH y apoya la hipótesis propuesta en tesis en relación a la resistencia de la

comunidad fúngica frente a la perturbación. Las unidades formadoras de colonias totales (bacterianas y fúngicas) alcanzaron valores de 10^5 y 10^7 UFC/g, para suelo árido y semiárido respectivamente, estas diferencias en abundancia y/o actividad microbiana permitirían explicar en parte el comportamiento de los microcosmos en relación a la perturbación aplicada. Valores de UFC/g similares a los encontrados a esta tesis se describen en la literatura para suelos áridos a través del mundo, los cuales varían entre menos de 10 a $1,6 \times 10^7$ (Bhatnagar & Bhatnagar 2005). Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que en suelos áridos y semiáridos de Chile, las bacterias cultivables alcanzaron valores de 10^6 y 10^7 UFC/g, respectivamente (Orlando y cols., al 2007; Orlando y cols. 2010).

Al analizar los resultados de UFC/g obtenidas durante el experimento y los aislados obtenidos de cada microcosmos (ver matriz de presencia ausencia) se observó que en el caso de los aislados fúngicos, están mayoritariamente presentes en los microcosmos centrifugados, lo que indicaría que esta estrategia experimental asegura una mejor recuperación de la microbiota en especial de las estructuras miceliales las cuales son difícil de precipitar en forma pasiva (decantación). Por lo tanto los datos presentados en esta tesis están enfocados en el tratamiento de centrifugación, el cual precipita de forma efectiva las formas celulares fúngicas presentes en la fase líquida.

Hasta ahora, los estudios que reportan una relación entre el pH del suelo y la diversidad bacteriana o fúngica, son en su mayoría por comparación de suelos con pHs naturalmente ácidos, neutros o básicos (Fierer y Jackson 2006; Hartman y cols., 2008) o en suelos que se han ido acidificando por un largo periodo de tiempo (años) por efecto de fertilización u otra perturbación crónica. (Penannen y cols., 1998, Enwall y cols., 2005). Por lo tanto, esta tesis propuso estudiar el efecto de una perturbación crónica (acidificación)

en un ensayo de microcosmos con el propósito de evaluar si la comunidad bacteriana y fúngica responden a esta perturbación.

Aislados bacterianos y fúngicos, tratamientos a pH 3.

Debemos considerar que el aislamiento microbiano es una técnica que no siempre refleja la composición de la microbiota presente en la muestra, ya que los medios de cultivo imponen una selección positiva para aquellos microorganismos que capaces de crecer en las condiciones experimentales impuestas, pero una fracción considerable de la microbiota permanece como no cultivable (Rappe' & Giovannoni, 2003). En este estudio, el pH fue una presión de selección sobre la microbiota cultivable, cuyo objetivo era detectar la presencia de filotipos acidófilos y/o tolerantes a las condiciones ácidas. Si bien la fracción cultivable no refleja la composición de la microbiota, hay estudios que muestran que los métodos dependientes de cultivo son críticos para los estudios de diversidad ya que los resultados obtenidos a través de este método serían complementarios a los obtenidos por los métodos moleculares, revelando la presencia de organismos no detectados por las técnicas moleculares (Donachie 2007), pero que responden a la presión de selección.

Los aislados bacterianos obtenidos desde los microcosmos de suelos a pH 3, aunque presentan diferencias morfológicas a nivel de la colonia, todos ellos se relacionaron con el género *Rhodospirillum*. Este género pertenece a las Proteobacterias y agrupa a bacterias gram negativas. La especie tipo es *Rhodospirillum rubrum* y está descrito que según el medio de cultivo utilizado y la condición de crecimiento a la que se le haya expuesto, pueden presentar una gran variación morfológica y fisiológica lo que podría explicar las diferencias previamente vistas en los aislados encontrados (Holt y cols., 1994). El pH de

crecimiento para las distintas especies conocidas de *Rhodospirillum* se describe entre 6,5 y 7,5, lo que nos estaría indicando que las especies aisladas en este estudio, que exhiben crecimiento a pH inferiores, serían ácido tolerantes, pero no acidófilas. Esto se corrobora cuando se analiza el crecimiento bacteriano y se compara la tasa de crecimiento de los aislados a los distintos pHs, se observa que los aislados obtenidos a pH 3, a pesar de la fuerte presión de selección siguen creciendo mejor a pH más altos. Por otra parte, aunque se identificó que todos los aislados corresponderían al mismo género, la tasa de crecimiento bajo las mismas condiciones de cultivo es diferente, indicando que hay una diversidad a nivel de especie o cepa en estos aislados. Además, cabe destacar que *Rhodospirillum* posee un metabolismo muy variable descrito como facultativo, que puede crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas utilizando distintas fuentes de carbono y energía (Holt y cols., 1994). Por otra parte, dado que la identificación es sólo por identidad con la secuencia en la base de datos podría tratarse de especies *Rhodospirillum* distintas a las descritas.

Cuando se analizan los aislados fúngicos se encuentra que éstos son más diversos que los aislados bacterianos, ya que se encontraron hongos que se asocian a distintas clases fúngicas. Además fue posible obtener aislados fúngicos en ambos tipos de suelos, sugiriendo que la fracción fúngica es más resistente a la perturbación de acuerdo a lo propuesto en la hipótesis. En general, los suelos áridos exhiben una importante diversidad fúngica, se describen que ellos tienden a ser dominantes en suelos con bajo pH (Ritz 2007) y que la mayor limitación de estos ecosistemas es el contenido de materia orgánica. Si se analizan los aislados obtenidos en esta tesis, ellos pertenecieron a diferentes clases fúngicas, aunque, la mayoría se agrupó en la división Ascomycota. Similares resultados son reportados en la literatura, usando técnicas de aislamiento dependientes de

cultivo, States & Christensen (2001) encontraron que los ascomicetes representaron un 98% de las 58 especies fúngicas aisladas en desiertos de Norteamérica; mientras que Grishkan y cols., (2006) encontraron que representantes de esta división alcanzaron un 95% de las 86 especies de hongos aisladas desde el Desierto de Negev.

Por otra parte las tasas de crecimiento de los aislados fúngicos, indican que algunos de ellos crecen mejor a pH 3 y que por lo tanto tendrían un comportamiento acidófilo, distinto a lo observado en los aislados bacterianos. Rousk y cols., (2010) observaron un comportamiento similar de las comunidades microbianas por efecto del pH y concluyeron que la aparentemente influencia más fuerte del pH sobre la composición de la comunidad bacteriana es probablemente debida a los estrechos rangos de pH óptimo para el crecimiento de las bacterias (Rosso y cols., 1995; Fernández-Calviño y Bååth 2010), mientras que la influencia más débil del pH sobre la composición de la comunidad de hongos es consistente con los estudios de cultivo puro que demuestran que los hongos presentan un rango de pH más amplio para un crecimiento óptimo y que estos en cultivo mostrarían preferencia por ciertos valores de pH dependiendo del taxa del hongo. (Wheeler y cols., 1991; Nevarez y cols., 2009). Estas observaciones también se relacionan con los resultados obtenidos en los perfiles de T-RFLP.

Al analizar la proporción de bacterias y hongos encontramos que estos últimos son más abundantes en comparación a las bacterias a pH ácido, lo que podría también estar en concordancia con lo observado por Rousk y cols., (2008), donde señalan que si la comunidad bacteriana del suelo es inhibida, el crecimiento fúngico es estimulado. Aunque no está claro aún si es un efecto producido directamente por la influencia del pH o por la dinámica misma de la comunidad bacteriana. (Rousk y cols., 2010)

Patrones comunitarios y Composición de filotipos.

El pH tiene numerosos efectos no sólo sobre la actividad metabólica de los microorganismos sino también sobre los patrones de distribución, abundancia y diversidad de las comunidades microbianas (Nicol et al 2008, Rousk et al 2010). Por otra parte, si el suelo es un importante reservorio de diversidad microbiana, cambios drásticos de pH podrían favorecer la abundancia relativa de poblaciones microbianas minoritarias del suelo modificando la diversidad y composición de las comunidades microbianas del suelo sometidas a la perturbación.

En esta tesis se evaluó el efecto del pH sobre la estructura de la comunidad microbiana total de cada microcosmos mediante perfiles de TRFLP. Esta aproximación experimental, mediante amplificación de un marcador molecular permitiría detectar la fracción cultivable y no-cultivable, lo cual representaría mejor la estructura comunitaria al compararla sólo con la fracción cultivable de acuerdo a los antecedentes reportados por Orlando et al (2007). Los perfiles de TRFLP para el marcador rDNA 16S (comunidad bacteriana) muestran que la estructura de la comunidad bacteriana de suelos semiáridos obtenidas a los pH 3 y pH 5 es muy similar entre sí y difieren de la estructura de la comunidad bacteriana a pH 7. Estos patrones de TRFLP revelan la presencia de filotipos distintos en los microcosmos tratados a pH 3 y pH5. Este cambio comunitario coincide con la evidencia de que la diversidad filogenética de procariotas en hábitat extremos tales como el drenaje ácido de minas presentan nuevos filotipos que realizan funciones geoquímicas relevantes y que son filogenética y funcionalmente distintos de aquellos que se encuentran en suelos neutros (Haferburg & Kothe 2007; Leveille y cols., 2001).

Por su parte, los perfiles de TRFLP obtenidos para los microcosmos de suelos áridos revelan que las diferencias en las estructuras de las comunidades bacterianas obtenidas a los distintos pH son principalmente debidas a cambios en la abundancia de los TRFs detectados, los cuales, en general se encuentran presentes en las comunidades que se obtienen después de los tratamientos a los distintos pHs.

En el caso de los perfiles de TRFLP obtenidos para el marcador molecular fúngico ITS desde los microcosmos de suelo semiárido y árido se observan TRFs compartidos entre los microcosmos con pequeños cambios en su abundancia. Esto estaría de acuerdo con los indicios que existen acerca de que los patrones espaciales exhibidos por las comunidades fúngicas estarían menos correlacionados con el pH del suelo (Rousk y cols., 2010), a diferencia de lo descrito para las comunidades bacterianas (Fierer & Jackson 2006). Aunque algunos hongos micorrícicos, que establecen simbiosis con la mayoría de las plantas podrían afectarse de manera importante por la acidificación del suelo (Pereira y cols., 2007).

Por otra parte la baja concentración de materia orgánica y la ausencia de polímeros complejos derivados de plantas, que caracteriza los suelos áridos (Bates y col. 2010) podrían imponer otras presiones de selección además de la acidificación que afecten de manera diferencial a las comunidades bacterianas versus la comunidades fúngicas.

Además debemos considerar que los perfiles TRFLP y en general los patrones de “DNA fingerprinting” deben ser interpretados cuidadosamente ya que, por ejemplo, las poblaciones microbianas que no son dominantes numéricamente no son representadas en los perfiles, porque los templados de DNA de estas poblaciones representan una pequeña

fracción de la comunidad total (Liu y cols., 1997) no detectable por PCR. Consecuentemente, la diversidad de especies de la comunidad microbiana es subestimada y puede ser que esas comunidades menos dominantes hayan sido más afectadas por la perturbación de pH y no se haya visto reflejado en los perfiles (Dunbar y cols., 1999). La otra posibilidad es que el tiempo de tratamiento con la perturbación aplicada no haya sido suficientemente largo para afectar a las comunidades fúngicas presentes, además debemos considerar el efecto amortiguador del mismo suelo con respecto a la real variación de pH, particularmente el suelo árido, sin olvidar que en la comunidad bacteriana se observan diferencias en los filotipos presentes y sus abundancias en los distintos tratamientos, indicando que la perturbación aplicada es detectada por la comunidad receptora.

Adicionalmente esta tesis propuso evaluar el efecto de la acidificación sobre la composición de filotipos bacterianos y fúngicos que componen la comunidad mediante la construcción de genotecas. La comparación entre las genotecas bacterianas y fúngicas obtenidas a pH 3 con aquellas descritas previamente para estos suelos a pH 7 muestra que hay 3 grupos bacterianos que se hacen indetectables por efecto de la acidificación: Verrucomicrobia, Bacteroidetes y Cloroflexi, lo que nos estaría indicando que los representantes de estos phylum presentes en suelos áridos no serían tolerantes a las condiciones ácidas. Sin embargo, según los datos obtenidos por Rousk, (2010) la abundancia en el suelo del grupo Bacteroidetes no tendría una clara relación con el pH en los suelos ensayados.

También se observó una disminución del grupo de las Actinobacterias en los microcosmos de suelos áridos a pH 3 y un aumento de las Proteobacterias y del grupo Nitrospirae al comparar con la genoteca a pH 7. Estos resultados contrastan con los

obtenidos por Rousk (2010) en los que se observa que para las Actinobacterias y Proteobacterias no existe una relación clara de dependencia con respecto al pH y para el grupo Nitrospira se observa una mayor abundancia a pHs más altos, aunque tampoco se observa una relación significativa con el pH de los suelos ensayados.

Esto indicaría que las Actinobacterias que se encuentran en suelo árido serían menos tolerantes al pH en comparación a los representantes de los grupos Proteobacterias y Nitrospirae que sí toleran el pH ácido.

Los antecedentes mostrados en esta tesis muestran que en general la fracción fúngica es más resistente a la perturbación aplicada. Esto también se observa en la comparación entre la genoteca de los microcosmos a pH 3 obtenida en esta tesis y la genoteca a pH 7 descrita por Farías y cols., (2011). En ambas situaciones se obtuvo que la mayoría de los clones pertenecen a la división ascomycota y que aproximadamente el 75% de los clones se agrupan principalmente en las clases Dothideomycetes y Eurotiomycetes. Similares resultados fueron obtenidos por Green y cols., (2008) quienes encontraron que un 83,3% de las secuencias de un genoteca de suelo del Desierto de Chihuahua se relacionaron con los ascomycota.

No obstante lo anterior, el tratamiento a pH 3 permite detectar otras clases fúngicas como Leotiomycetes, Saccharomycetes y Sordariomycetes, lo que sugiere que ellas aumentarían su abundancia hasta niveles detectables por PCR en los microcosmos de suelos acidificados. Seleccionándose los representantes de estos grupos más tolerantes al pH.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la disminución del pH afecta la comunidad microbiana, esto se corresponde con los que han descrito otros autores que

muestra que existe una correlación entre la diversidad de la comunidad microbiana y a química de los suelos (Rousk y cols., 2010), en particular con el pH del suelo que afecta la forma química, concentración y disponibilidad de los sustratos e influencia el crecimiento y la actividad microbiana (Nicol y cols., 2008).

CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis permitieron poner a prueba la hipótesis: “La acidificación del suelo producirían cambios en la diversidad de las comunidades microbianas de suelos áridos y semiáridos, siendo más afectadas las poblaciones bacterianas que las fúngicas, dado que estas últimas se describen como más resistentes a las condiciones ácidas”. Las principales conclusiones son:

- La acidificación sostenida de los microcosmos de ambos suelos produjo una disminución de las UFC a bacterianas a pH3, a diferencia de lo observado con UFC fúngicas que no mostraron disminución significativas a lo largo del experimento de microcosmos.
- En los tiempos finales de tratamiento sólo se pudieron aislar bacterias del microcosmo de suelo semiárido y pertenecieron al género *Rhodospirillum*, las fueron tolerantes a condiciones ácidas, pero no acidófilas. Por su parte algunos aislados fúngicos obtenidos de ambos microcosmos exhibe un mayor rango de tolerancia al pH con algunos aislados fúngicos acidófilos.
- La disminución del pH en los suelos áridos y semiáridos produjo cambios en la estructura de la comunidad bacteriana de acuerdo a los perfiles de T_RFLP, sin embargo la comunidad fúngica muestra patrones comunitarios más estables.
- La acidificación de los microcosmos también afecta la composición de la comunidad, produciendo cambios en la abundancia relativa de los principales grupos bacterianos. La misma perturbación, tiene menos efecto sobre la comunidad

fúngica que presentan abundancias similares para las principales clases de hongos y los cambios están restringidos a clases minoritarias.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, & DJ Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, 25, 3389 - 3402. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Bates ST, Garcia-Pichel F, & TH Nash III.** 2010. Fungal components of biological soil crusts: insights from culture-dependent and culture-independent studies. *Bibliotheca Lichenologica* 105: 197-210.
- Bardgett, R.** 2005. The diversity of life soil en *The biology of soil. A community and ecosystem approach* (Eds) MJ Crawley & C. Little. Oxford University Press Inc. pp. 24-56
- Belnap J & D Eldridge.** 2003. Disturbance and recovery of biological soil crusts. *En: Belnap J and OL Lange* (Eds). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. 1° Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. ISBN: 3540437576. pp. 365-383.
- Bergey's Manual of determinative bacteriology.** 1994. (Eds) Holt JG, NR Krieg, PHA Sneath, JT Staley & ST Williams. 9° edition pp. 359-370 William &Wilkins Maryland USA
- Bewley RJ & G Stotzky.** 1983. Effects of combinations of simulated acid rain and cadmium or zinc on microbial activity in soil. *Environ. Res.* 31:332-339.
- Bhatnagar A & M Bhatnagar.** 2005. Microbial diversity in desert ecosystems. *Curr. Sci.* 89:91-100.
- Bradford M.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Büdel B.** 2003. Biological soil crusts of South America. *En: Belnap J and OL Lange* (Eds). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. 1° Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. ISBN: 3540437576. pp. 51-55.
- Chanal, A., Chapon, V., Benzerara, K., Barakat, M., Christen, R., Achouak, W., Barras, F. & T Heulin.** 2006. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environ. Microbiol.* 8: 514–525.
- Drees KP, JW Neilson, JL Betancourt, J. Quade, DA Henderson, BM Pryor & RM Maier.** 2006. Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama desert, Chile. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7902-7908.

- Donachie S, Foster J & M Brown.** 2007. Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME J.* 1, 97-99.
- Dunbar J, LO Ticknor & CR Kuske.** 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16SrRNA genes from bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:190-197.
- Enwall K, L Philippot & S Hallin.** 2005. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8335-8343.
- Erickson HE, P Soto, DW Johnson, B Roath & C Hunsaker.** 2005. Effects of Vegetation Patches on Soil Nutrient Pools and Fluxes within a Mixed-Conifer Forest. *For. Sci.* 51:211-220.
- Farías F.** 2006. Efectos de la rizósfera de *Colletia hystrix* sobre la comunidad bacteriana del suelo. Memoria de Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile, 49 pp.
- Farías F. J Orlando, L Bravo, R Guevara & M Carú.** 2009. Comparison of soil bacterial communities associated with actinorhizal, non-actinorhizal plants and the interspaces in the sclerophyllous matorral from Central Chile in two different seasons *J. Arid Environ.* 73:1117-1124
- Farías F.** 2011. Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre la diversidad fúngica de suelos áridos. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile, 80 pp.
- Fernández-Calviño D & E Baath.** 2010. Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 149–156
- Fierer N & R Jackson.** 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:626-631.
- Forest HS & CR Weston.** 1996. Blue-green algae from the Atacama Desert of Northern Chile. *J. Phycol.* 2:163-164.
- Friedmann EI.** 1993. Extreme environments, limits of adaptation and extinction. *In:* Trends in Microbial Ecology. Proceedings of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology Guerrero and Pedros-Alio (Eds.), Spanish Society for Microbiology, Barcelona, pp. 9-12.
- Gajardo R.** 1994. La Vegetación Natural de Chile. Clasificación y Distribución geográfica. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 165 pp.
- Gallardo A & WH Schlesinger.** 1992. Carbon and nitrogen limitations of soil microbial biomass in desert ecosystems. *Biogeochem.* 18:1-17.

- Gardes M & TD Bruns.** 1993 ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118.
- Gillett JW & JM Witt.** 1980. Chemical evaluation: projected application of terrestrial microcosm technology. In J.P. Giesy (ed.) *Microcosms in Ecological Research*, pp. 1008-33. US Dept. of Energy.
- Gillett JW.** 1989. Terrestrial microcosms and mesocosms in ecotoxicologic research. In SA Levin (ed.) *Ecotoxicology: Problems and Approaches*, pp. 280-313, Berlin: Springer-Verlag.
- Girvan MS, Bullimore J, Pretty JN, Osborn AM & AS Ball.** 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1800-1809.
- Green L., Porrás-Alfaro A, & RL Sinsabaugh.** 2008: Translocation of nitrogen and carbon integrates biotic crust and grass production in desert grassland. *J. Ecol.* 96: 1076–1085.
- Grishkan I, Zaady E, & E Nevo.** 2006. Soil crust microfungi along a southward rainfall gradient in desert ecosystems. *Eur. J. Soil Biol.* 42: 33–42.
- Hartman WH, Richardson CJ, Vilgalys R & GL Bruland.** 2008. Environmental and anthropogenic control of bacterial communities in wetland soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 17842–17847.
- Haferburg G & E Kothe.** 2007. Microbes and metals: interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* 47, 453–467.
- Horz HP, A Barbrook, CB Field and BJM Bohannon.** 2004. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:15136-15141.
- Janssen PH.** 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Minireviews. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1719-1728.
- Johnson DW.** 1995. Soil properties beneath *Ceanothus* and pine stands in the eastern Sierra Nevada. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59:918- 924.
- Kieft TL, CS White, SR Loftin, R Aguilar, JA Craig & DA Skaar.** 1998. Temporal dynamics in soil carbon and nitrogen resources at a grassland–shrubland ecotone. *Ecology* 79:671–683.
- Kuske CR, LO Ticknor, ME Miller, JM Dunbar, JA Davis, SM Barns & J Belnap.** 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1854-1863.

- Leveille, SA, Leduc, LG, Ferroni, GD, Telang, AJ, & G Voordouw.** 2001. Monitoring of bacteria in acid mine environments by reverse sample genome probing. *Can. J. Microbiol.* 47, 431–442.
- Liu Wt, Marsh TL, Cheng H & LJ Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516– 4522
- McCann KS.** 2000. The diversity–stability debate. *Nature* 405:228-233.
- McKay CP, EI Friedmann, B Gomez-Silva, L Caceres-Villanueva, DT Andersen, & R Landheim.** 2003. Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: four years of observations including the El Nino of 1997-1998. *Astrobiology* 3:393-406.
- Meigs P.** 1953. World distribution of arid and semi-arid homoclimates. *In: UNESCO Arid Zone Res. Series N°1, Arid Zone Hydrology.* UNESCO. pp. 203-209.
- Menz F & H Seip.** 2004. Acid rain in Europe and the United States: an update. *Environ. Sci. Pol.* 7 (2004) 253–265.
- Nagy ML, Perez A & F Garcia-Pichel.** 2005. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54:233-245.
- Nevarez L, Vasseur V, Le Madec L, Le Bras L, Coroller L, Legue´rinel I et al.** 2009. Physiological traits of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water. *Int. J. Food. Microbiol.* 130: 166–171.
- Nicol G, Leininger S, Schleper C., & J Prosser.** 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol.* 10: 2966–2978
- OIES. Office for Interdisciplinary Earth Studies.** 1991. Arid ecosystems interactions: recommendations for drylands research in the global change research program. OIES-Report 6: 81.
- Orlando J, M Chávez, L Bravo, R Guevara & M Carú.** 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: 2769 – 2776
- Orlando J.** 2008 Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre la diversidad genética y funcional de microbiota bacteriana de suelos áridos. Tesis de Doctorado en Microbiología. Facultad de Ciencias - U. de Chile, 96 pp.

- Orlando J, M Alfaro, L Bravo, R Guevara & M Carú.** 2010. Bacterial diversity and occurrence of ammonia-oxidizing bacteria in the Atacama Desert soil during a “desert bloom” event. *Soil Biol. Biochem.* 42:1183-1188.
- Otter L & M Scholes.** 2005. Biogenic fluxes of carbon and nitrogen in arid and semi-arid ecosystems. *Geophys. Res. Abstr.* 7:09593.
- Pennanen T, H Fritze, P Vanhala, O Kiikkilä, S Neuvonen & E Bååth.** 1998. Structure of a microbial community in soil after prolonged addition of low levels of simulated acid rain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2173-2180.
- Pereira G, Herrera J, Machuca A, & M Sánchez.** 2007. Effect of pH on the in vitro growth of ectomycorrhizal fungi collected from *Pinus radiata* plantations. *Bosque* 28:215-219.
- Prescott CE & D Parkinson.** 1985. Effects of sulphur pollution on rates of litter decomposition in a pine forest. *Can. J. Bot.* 63:1436–1443.
- Prosser JI, TM Embley & G Webster.** 2003. The influence of selection pressures on species diversity, functional gene diversity and activity of ammonia-oxidizing bacteria. In: RS Hails, JE Beringer & HCJ Godfray (Eds), *Genes in the environment*. pp 187-202. Blackwell Publishing, Oxford
- Querol X, A Alastuey, S Rodríguez, F Plana, E Mantilla & C Ruiz.** 2001. Monitoring of PM10 and PM2.5 around primary particulate anthropogenic emission sources. *Atmos. Environ.* 35:845-858.
- Rainey FA, K Ray, M Ferreira, BZ Gatz, MF Nobre, D Bagaley, BA Rash, MJ Park, AM Earl, NC Shank, AM Small, MC Henk, JR Battista, P Kampfer & MS da Costa.** 2005. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5225-5235.
- Rappe', M.S., Giovannoni, S.J.,** 2003. The uncultured microbial majority. *Ann. Rev. Microbiol.* 57, 369–394.
- Ritz, K.** 2007. Spatial organization of soil fungi. En R.B. Franklin & AL Mills (eds). *The Spatial Distribution of Microbes in the Environment*, pp 179-202 Springer, The Netherlands
- Rosso L, Lobry JR, Bajard S & JP Flandrois.** 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 610–616.
- Rousk J., Baath E., Brookes P., Lauber C., Lozupone C, Caporaso J, Knight R & N Fierer.** 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.*, 1–12

- Sambrock J, EF Fritsh & T Maniatis.** 1989. Molecular cloning-a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schlesinger WH, JA Raikes, AE Hartley & AF Cross.** 1997. On the spatial pattern of soil nutrients in desert ecosystems. *Ecology* 77:364–374.
- Schimel J.** 2004. Playing scales in the methane cycle: from microbial ecology to globe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:12583-12587.
- States, JS & M Christensen.** 2001. Fungi associated with biological soil crusts in desert grasslands of Utah and Wyoming. *Mycologia* 93: 432–439.
- Strickland M., & J Rousk.** 2010. Considering fungal:bacterial dominance in soils e Methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biol. Biochem.* 42. 1385- 1395.
- Stursova M, CL Crenshaw, & RL Sinsabaugh.** 2006. Microbial responses to long-term N deposition in a semiarid grassland. *Microb. Ecol.* 51:90-98.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & S Kumar.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Van der Heijden Marcel, Bardgett Richard D, & M Van Straalen Nico** (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11: 296–310
- Varnero M.** 2008. Bacterias en Ambiente terrestre. En: Biodiversidad de Chile: Patrimonio y Desafios 2^a Edición 383-385. Chile. CONAMA.
- Waldrop M & M Firestone.** 2006. Seasonal dynamics of microbial community composition and function in oak canopy and open grassland soils. *Microb. Ecol.* 52:470-479.
- Webster G, TM Embley & JI Prosser.** 2002. Grassland management regimens reduce smallscale heterogeneity and species diversity of β -protobacteria ammonia oxidizer populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:20-30.
- Weisburg W, Barns S, Peletier D & D. Lane** 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* pp. 697-703 Vol. 173, No. 2.
- Wheeler KA, Hurdman BF& JI Pitt.** 1991. Influence of pH on the growth of some oxigenic species of Aspergillus, Penicillium and Fusarium. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 141–150.
- Wolters V, WL Silver, DE Bignell, DC Coleman, P Lavelle, WH van der Putten, P de Ruiter, J Rusek, DH Wall, DA Wardle, L Brussaard, JM Dangerfield, VK Brown, K Giller, DU Hooper, O Sala, J Tiedje & JA van Veen.** 2000. Effects of

global changes on above- and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: implications for ecosystem functioning. *BioSci.*50:1089-1098.

Yeager CM, JL Kornosky, DC Housman, EE Grote, J Belnap & CR Kuske. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Appl. Environ. Microbiol.*70:973-983.

ANEXOS

I. Cálculo de la tasa de crecimiento bacteriano específico (μ)

Para calcular la tasa de crecimiento bacteriano (μ) se usó el aumento de la masa celular (en este caso, la concentración de proteína en el tiempo).

Si se calcula (μ) en función del aumento de masa celular:

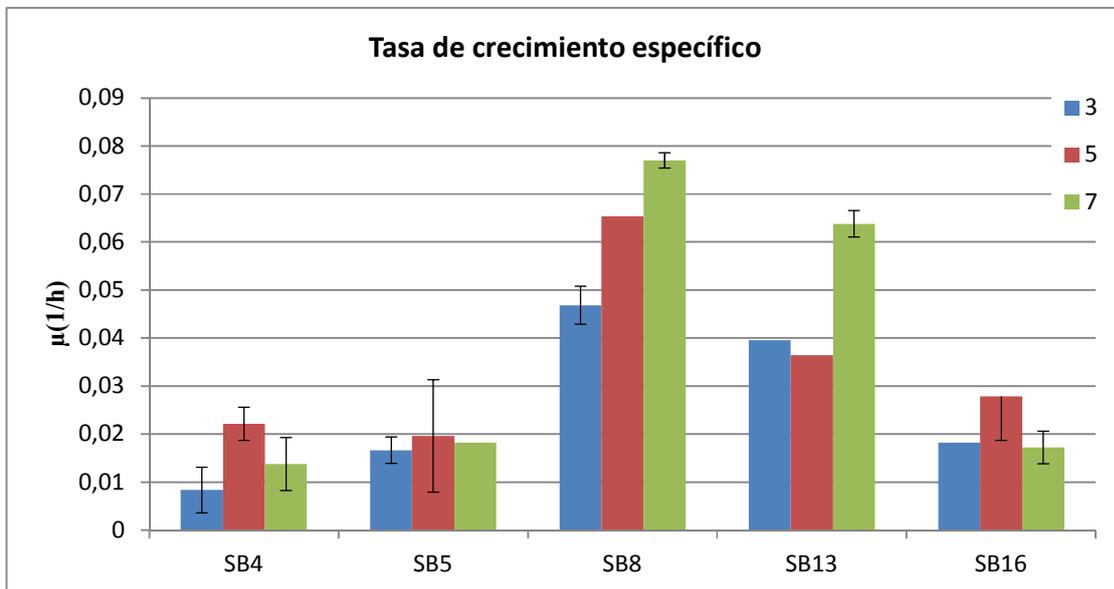
Podemos decir que $[(dM/M)/dt] = \mu$, por lo tanto $dM = M \cdot \mu \cdot dt$

Si integramos, resulta: $M/M_0 = e^{\mu (t-t_0)}$

Aplicando logaritmos neperianos: Tenemos que $\ln[M/M_0] = \mu (t-t_0)$

De aquí se puede deducir que el coeficiente μ es: $\mu = \ln M/M_0 / (t-t_0)$ (expresado en h^{-1})

Obteniéndose:

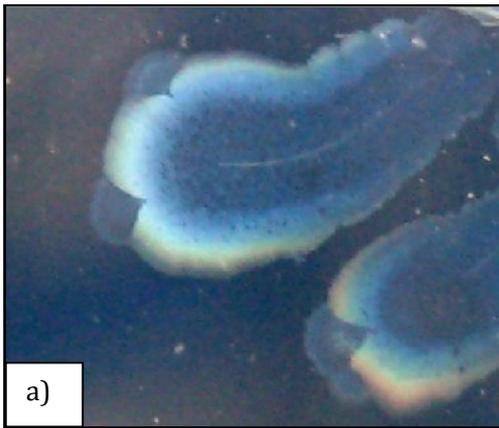


II. Morfología de la colonia de aislados bacterianos

Características macroscópicas.

Aislado SB5

Colonia en medio salino pH 3, colonia tornasol, bordes redondeados irregulares (a)

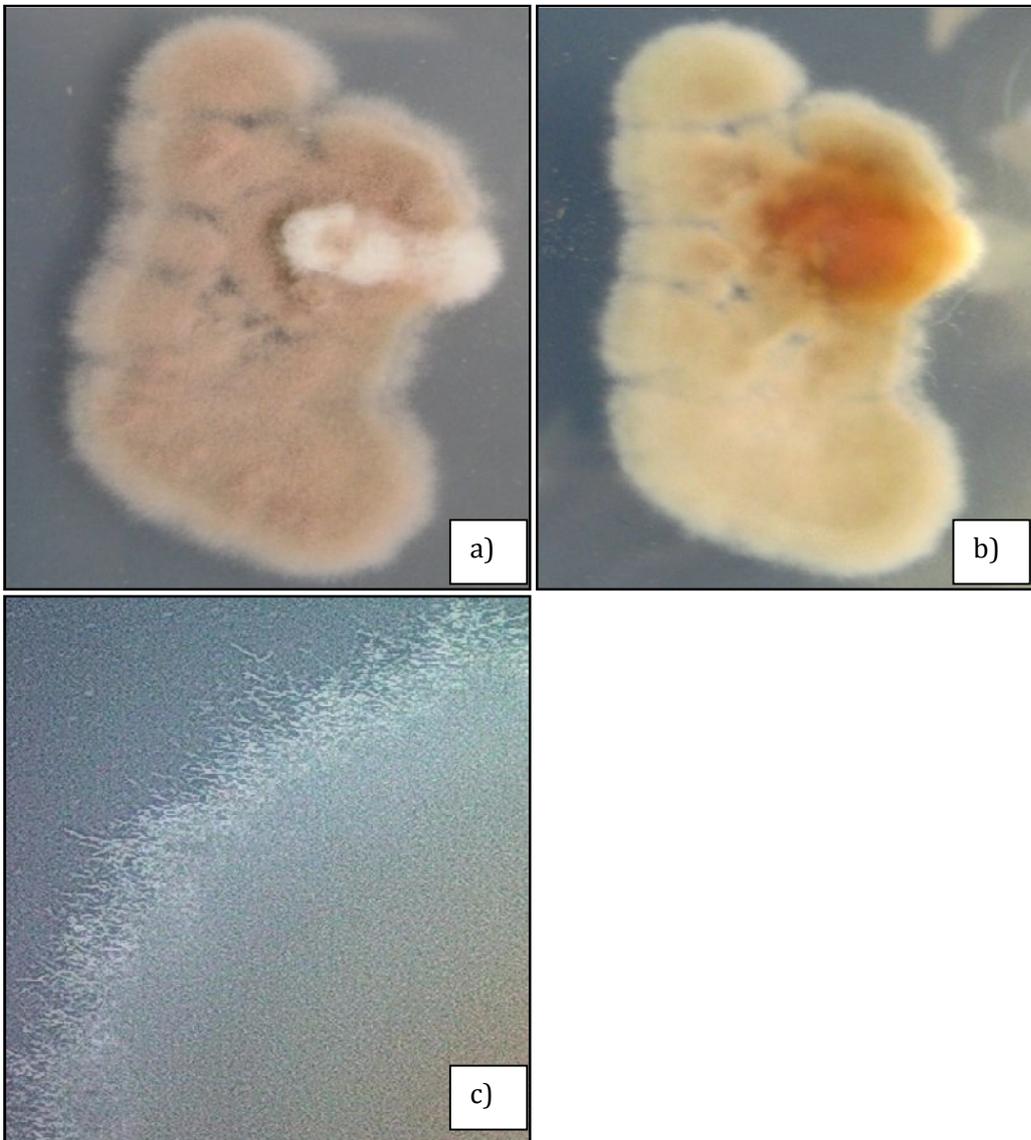


III. Morfología de los aislados fúngicos

Características macroscópicas

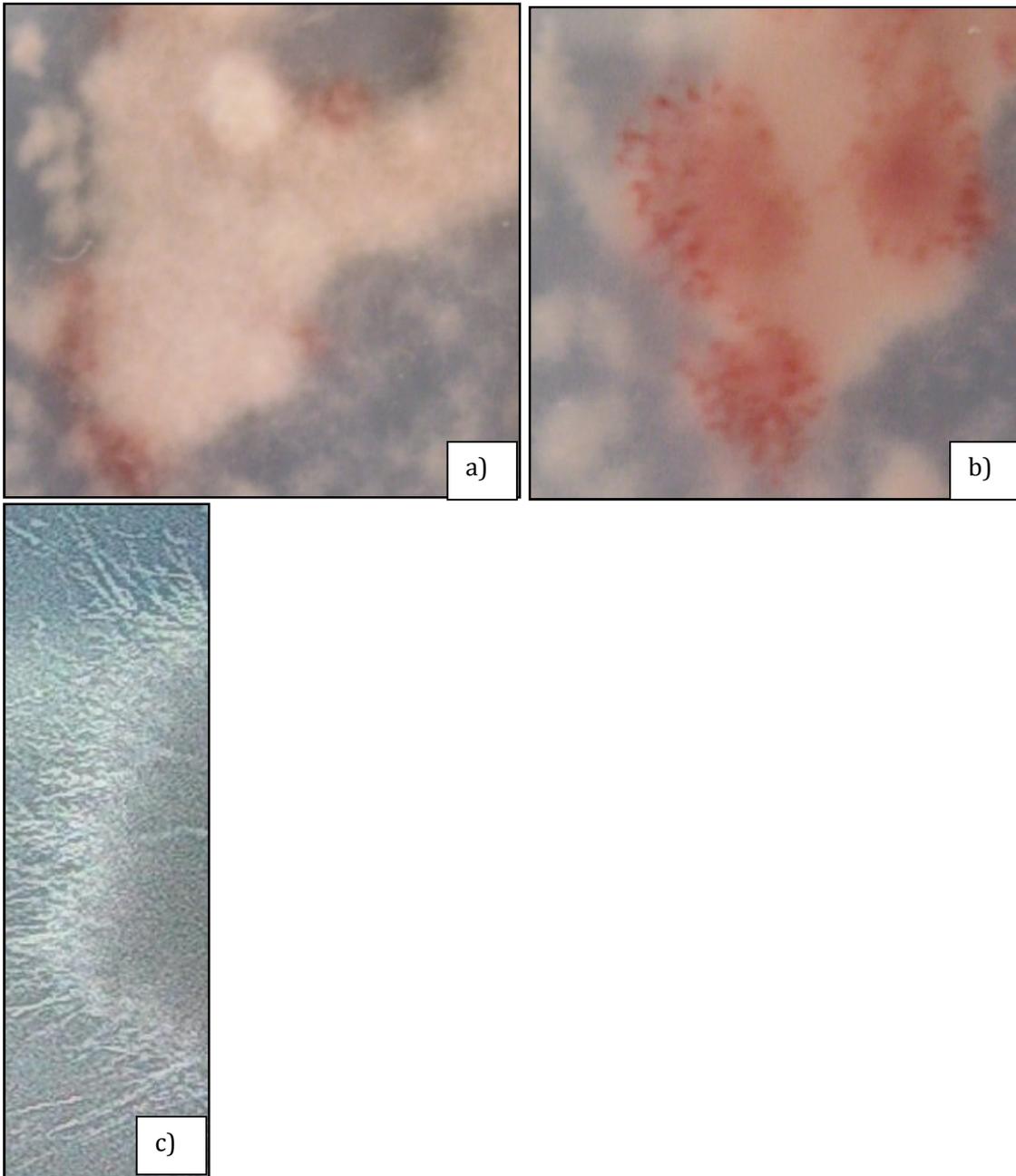
Aislado SH4

Colonia en medio salino pH 3, colonia pulverulenta de color rosa pálido, bordes algodonosos (a), reverso beige y naranja (b). Colonias de bordes redondeados irregulares (c).



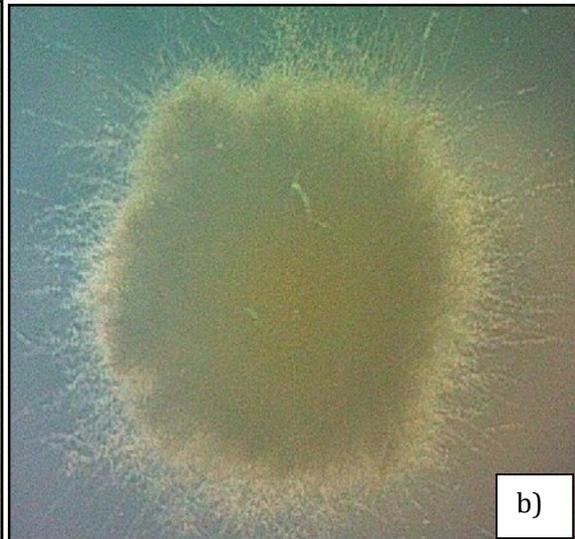
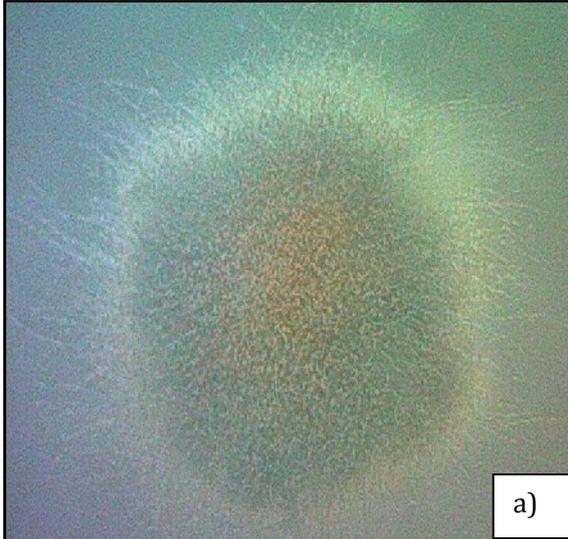
Aislado SH14

Colonia en medio salino pH 3, colonia algodonosa color rosa pálido (a), reverso rosa y rojo (b). Colonias de bordes irregulares (c).



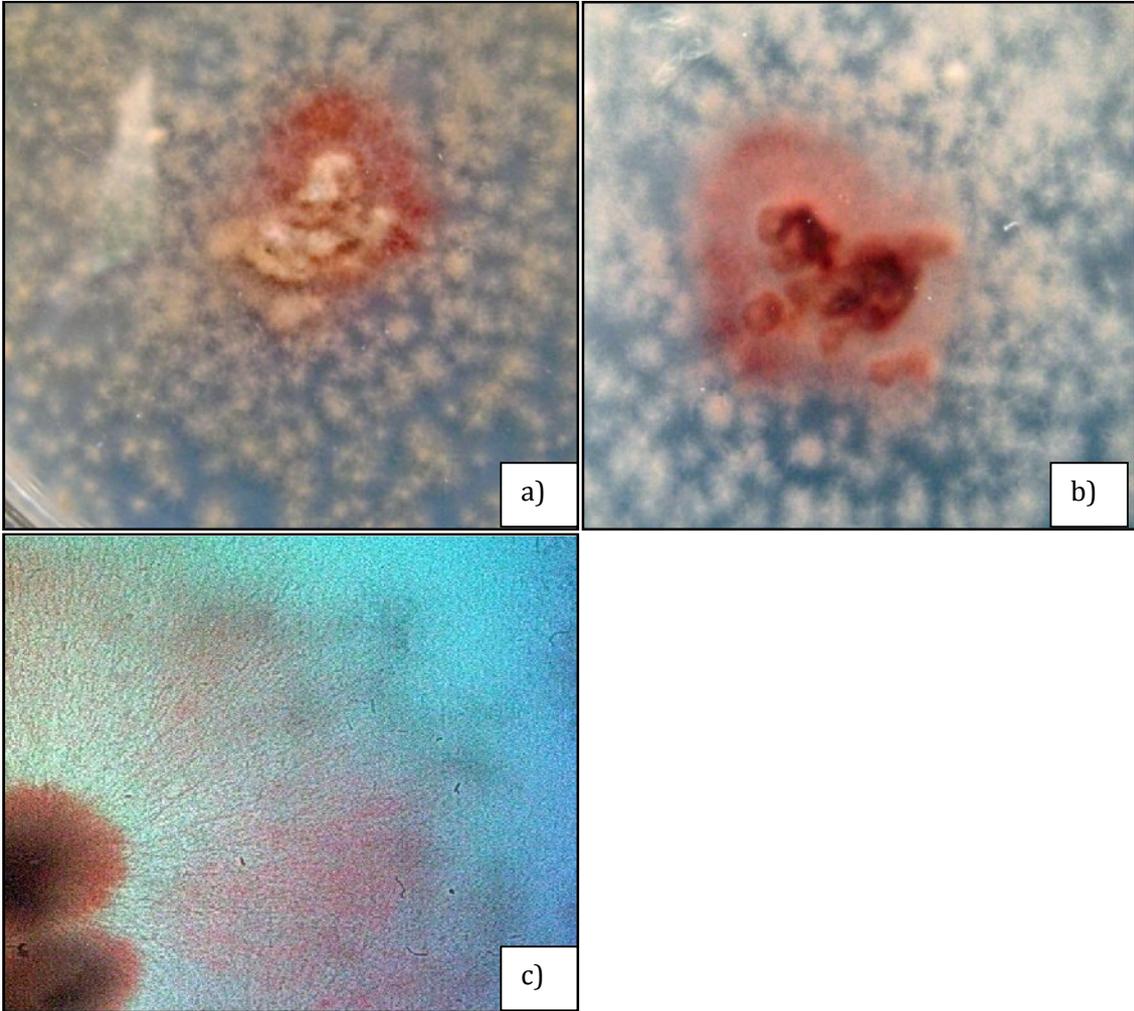
Aislado SH17

Colonia en medio salino pH 3, colonia pulverulenta de bordes algodonoso (a), reverso naranja y verde (b). Colonias redondeadas de borde regular (c)



Aislado AH124-1

Colonia en medio salino pH 3, algodonosa rosada (a), reverso rosado (b). Colonias redondas de borde irregular (c)



Aislado AH125-4

Colonia en medio salino pH 3, colonia tipo algodón naranja con centro en relieve (a),
reverso naranja (b). Colonias redondas de borde irregular (c)

