

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***CUANTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON PROCESOS
CLAVES DEL CICLO DEL NITRÓGENO EN SUELOS ANTÁRTICOS
CON INFLUENCIA DE ASENTAMIENTOS ANIMALES***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica
Ambiental y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

STEFANIA DOMÉNICA IANNUZZI FIERRO

**Directora de Tesis: Dra. Julieta Orlando
Co-directora de Tesis: Dra. Margarita Carú**

Santiago-CHILE

Julio 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

STEFANIA DOMÉNICA IANNUZZI FIERRO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización de Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día _____

Directora de Tesis:

Dra. Julieta Orlando

Co-directora de Tesis:

Dra. Margarita Carú

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez

Dra. Tatiana Garrido

Dra. María Cecilia Rojas

*Alla mia grande Famiglia:
A ustedes que han sabido aguantar mis tempestades.
¡Infinitas Gracias!*

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia que siempre me ha dado su apoyo incondicional, que ha sabido sostenerme y soportar mis humores durante estos años. Mamá, gracias por darme ánimo cada mañana en que el cansancio era más que mis ganas, por la paciencia de todos los días. Papá, gracias por mostrarme que siempre se puede y que hasta las peores situaciones tienen solución. A mis hermanos, Luigi, aunque nunca me lo dice siempre está preocupado; Brunella, mi fiel compañera de series y Roquito, el comensal “inesperado” de los bocadillos de madrugada. Ustedes que en más de alguna ocasión fueron mis compañeros de estudios en noches que se eternizaban, gracias por dejarme ser, a veces, la hermana menor, por sus locuras y por hacerme entrar en razón, por hacerme reír y por, sobre todo, el cariño. A mis nonnos, a mis tíos y primos que siempre han estado, gracias por el cariño y el apoyo.

Andrés, que fue un pilar fundamental en mi paso por la universidad, ha estado siempre a mi lado, hasta en los peores momentos. Siempre supo como contenerme cuando la frustración me superaba, y me ha apoyado hasta en las más locas ideas. Gracias por acceder a mis caprichos, a mis antojos y por reírte de mis tonteras, sé que siempre cuento contigo para todo.

Coni, llegaste como amiga de la Brune y te quedaste como “hermana perdida”, gracias por los cupcakes, las conversaciones sobre procesos químicos y por el cariño. A los Tres Mosqueteros, Nacho y Gabo, gracias por las locuras compartidas, por no ser políticamente correctos y por dejarme ser como soy sin pensar que estoy loca.

Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Julieta Orlando y a la Dra. Margarita Carú (mi directora y co-directora de tesis) por recibirme en su laboratorio además, por la confianza depositada en mí y por la paciencia que han tenido durante todo este proceso. Aprovecho de agradecer a las personas que conocí en el laboratorio, Juanita, gracias por mantener el orden en el lab y por recibirme siempre con una sonrisa, a Camila por enseñarme sobre qPCR, Lía que tuvo la paciencia de enseñarme y entrenarme en todo lo que hice para la tesis, a Diego, a Ceci y Kathy que siempre estaban para conversar de cualquier cosa. A ustedes y a quienes olvido, gracias por hacer del trabajo en el lab una estancia agradable.

Presentaciones a Congresos

La presente tesis dio origen a las siguientes comunicaciones:

Presentaciones a congresos internacionales

Iannuzzi, S., Ramírez-Fernández, L., Carú, M., Farías, L., Orlando, J. Settlements of sea animals increase nitrous oxide emissions in Antarctic soils. “Ecology of soil microorganisms”. FINLANDIA, Helsinki, 2018.

Iannuzzi, S., Ramírez-Fernández, L., Carú, M., Farías, L., Orlando, J. Los asentamientos de animales marinos aumentan la emisión de óxido nítrico en suelos antárticos. “IX Congreso latinoamericano de ciencia antártica”. CHILE, Punta Arenas, 2017.

Ramírez-Fernández L., Ramírez, R.A., **Iannuzzi, S.**, Carú, M., Trefault, N., Orlando, J. Rhodospirillum dominate soil bacterial communities from marine animal settlements in maritime Antarctica. “16th International Symposium on Microbial Ecology”. CANADA, Montreal. 2016

Financiamiento

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Fue financiada por el proyecto INACH RG_14-14.

Agradecimientos al laboratorio de Genética y Biotecnología y al Centro de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por el uso del equipo de qPCR.

TABLA DE CONTENIDO

PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	iii
FINANCIAMIENTO	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
<i>Recolección de muestras</i>	9
<i>Determinación de parámetros edáficos</i>	11
<i>Extracción de DNA del suelo</i>	14
<i>Clonación</i>	15
<i>Cuantificación de genes mediante qPCR</i>	18
<i>Análisis de datos y relaciones</i>	21
RESULTADOS.....	23
<i>Determinación de los parámetros edáficos</i>	23
<i>Extracción de DNA</i>	25
<i>Estandarización y clonación</i>	27
<i>Curvas de calibración</i>	29
<i>Abundancia de genes funcionales</i>	32
<i>Abundancias vs parámetros edáficos</i>	33
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES.....	45
REFERENCIAS	46
ANEXO.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo del Nitrógeno.....	2
Figura 2 Sitios de muestreo en el Cabo Shirreff (Isla Livingston).....	10
Figura 3 Curva de calibración de fósforo.....	13
Figura 4. Parámetros edáficos.....	26
Figura 5. Estandarizaciones del gen <i>nifH</i>	28
Figura 6. Diluciones seriadas para las curvas estándar de cada gen.....	30
Figura 7. Curvas y eficiencia de amplificación.....	31
Figura 8. Abundancias de genes por tipo de suelo.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores funcionales.....	16
Tabla 2. Programas PCR.....	17
Tabla 3. Mezclas de reacción PCR.....	19
Tabla 4. Concentración del DNA extraído.....	27
Tabla 5. Relación entre parámetros edáficos y abundancia de genes.....	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Amplificación por PCR en tiempo real del gen <i>nifH</i>	54
Anexo 2 Amplificación por PCR en tiempo real del gen <i>amoA</i>	55
Anexo 3 Amplificación por PCR en tiempo real del gen <i>narG</i>	56
Anexo 4 Amplificación por PCR en tiempo real del gen <i>nirK</i>	57
Anexo 5 Amplificación por PCR en tiempo real del gen <i>nirS</i>	58
Anexo 6 Amplificación por PCR en tiempo real del gen <i>norB</i>	59
Anexo 7 Amplificación por PCR en tiempo real del gen <i>nosZ</i>	60
Anexo 8 Parámetros edáficos.....	61
Anexo 9 Abundancias de genes por tipo de suelo.....	61

RESUMEN

El ciclo del nitrógeno es central para la biogeoquímica del planeta y presenta grandes flujos naturales desde la atmósfera hacia los ecosistemas. La biogeoquímica del nitrógeno depende casi por completo de las reacciones de óxido-reducción que son llevadas a cabo, principalmente, por bacterias, pues a pesar de que el 78% de la atmósfera terrestre está formada por nitrógeno molecular, éste no está mayormente biodisponible y solo un limitado número de microorganismos son capaces de convertirlo en nitrógeno reactivo. En las etapas de transformaciones inorgánicas, el ciclo del nitrógeno incluye la reducción de nitrógeno molecular a amonio, que podría considerarse el paso inicial de la utilización del nitrógeno por los seres vivos, para después pasar éste a nitrito y nitrato, y posteriormente a los correspondientes óxidos de nitrógeno mediante el proceso de desnitrificación, finalizando el ciclo con la producción de nitrógeno molecular.

El aumento del nitrógeno en un ecosistema puede tener impactos potencialmente importantes en las dinámicas microbianas, sin embargo, el entendimiento de cómo este aumento puede afectar a dichas comunidades permanece incompleto. Esto adquiere mayor importancia en la Antártica, donde se encuentra un aumento de los niveles de nitrógeno como consecuencia de perturbaciones animales y antropogénicas.

Las zonas libres de hielo en la Antártica están sometidas a bajas temperaturas, y sus suelos presentan típicamente bajos niveles de humedad, de carbono y de nitrógeno, además de tener poca capacidad amortiguadora de pH. Una excepción son los suelos influenciados por asentamientos de animales, los cuales son ricos en

deposiciones animales, y están enriquecidos en nitrógeno y carbono orgánico total. Estas condiciones permiten una gran actividad de las diferentes comunidades bacterianas que reciclan los nutrientes, por lo que es esencial el conocimiento de los grupos funcionales bacterianos presentes allí para tener una mejor comprensión del rol que cumplen en la mantención del ciclado de nutrientes.

En esta tesis determinamos la abundancia de los grupos funcionales bacterianos claves en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, utilizando marcadores moleculares, en suelos influenciados por asentamientos animales ubicados en el Cabo Shirreff (Isla Livingston), una zona caracterizada por ser un punto importante de diversidad faunística. Los suelos influidos por animales marinos, especialmente pingüinos, presentaron una alta cantidad de nutrientes, principalmente nitrato, amonio y fósforo. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se detectaron diferencias significativas en la abundancia de los marcadores moleculares entre los suelos influidos por animales y los controles.

Los genes más abundantes fueron *narG* y *nifH*, y los menos abundantes *nirK* y *nosZ*. Este último fue el único gen que presentó diferencias significativas con respecto al control, específicamente en una de las pingüineras (Pa). Finalmente, las abundancias de los genes *nifH* y *norB* no presentaron relaciones lineales significativas con ninguna de las variables edáficas. Las relaciones entre abundancias y parámetros edáficos fueron siempre positivas, con excepción de *nifH* que presentó algunas relaciones negativas. Los genes *amoA*, *narG*, *nirK*, *nirS* y *nosZ*, mostraron relaciones lineales positivas y significativas con el amonio en el suelo. Por otra parte, *narG* y *nosZ* presentaron las mejores relaciones, y

significativas, entre sus niveles de abundancia y nutrientes del suelo como amonio, nitrato y fósforo, además de la conductividad.

ABSTRACT

The nitrogen cycle is central to the biogeochemistry of the planet and has large natural flows from the atmosphere to ecosystems. The biogeochemistry of nitrogen depends almost entirely on the redox reactions that are carried out mainly by bacteria. Despite that 78% of the Earth's atmosphere is formed by molecular nitrogen, it is not largely bioavailable and only a limited number of microorganisms can convert N_2 into reactive nitrogen. In the stages of inorganic transformations, the nitrogen cycle begins with the reduction of molecular nitrogen to ammonium, which could be considered the initial step of the use of nitrogen by living beings; then it is converted to nitrite and nitrate, and subsequently to the corresponding nitrogen oxides through the denitrification process, ending the cycle with the production of molecular nitrogen.

The increase of nitrogen levels in an ecosystem can have potentially important impacts on microbial dynamics; however, the understanding of how this increase may affect these communities remains incomplete. This becomes more important in Antarctica, where there is an increase in nitrogen levels as a result of animal and anthropogenic disturbances.

Ice-free zones in Antarctica are subjected to low temperatures, and their soils have typically low levels of humidity, carbon and nitrogen, in addition to a little buffering capacity. An exception are soils influenced by animal settlements, which are rich in animal depositions, and enriched in nitrogen and total organic carbon. These conditions allow a great activity of the different bacterial communities that recycle nutrients, so it is essential to know the bacterial functional groups which are present

to have a better understanding of the role that they are playing in the maintenance of the nutrient cycling.

In this thesis we determine the abundance of the key bacterial functional groups in the biogeochemical cycle of nitrogen, using molecular markers, in soils influenced by animal settlements located in Cape Shirreff (Livingston Island), an area characterized by being an important point of fauna diversity. The soils influenced by marine animals, especially penguins, presented a high amount of nutrients, mainly nitrate, ammonium and phosphorus. However, in most cases no significant differences were detected in the abundance of molecular markers between the soils influenced by animals and the controls.

The most abundant genes were *narG* and *nifH*, and the least abundant ones *nirK* and *nosZ*. The latter (*nosZ*) was the only gene that presented significant differences compared to the control, specifically in one of the penguins' settlements (Pa). Finally, the abundance of the *nifH* and *norB* gene did not present significant linear relationships with any of the edaphic variables. The relation between abundances and edaphic parameters were always positive, with the exception of *nifH* that presented some negative relations. The *amoA*, *narG*, *nirK*, *nirS* and *nosZ* genes showed positive and significant linear relations with ammonium in the soil. Moreover, *narG* and *nosZ* presented the best and most significant relationships between their abundances and the soil nutrients as ammonium, nitrate and phosphorus, in addition to the conductivity.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) está presente en el ambiente en diversas formas, tanto orgánicas como inorgánicas. En los suelos, el nitrógeno se encuentra fijado a la materia orgánica donde está ligado a compuestos orgánicos tales como proteínas, aminoácidos, azúcares aminados y desechos de animales como urea o ácido úrico, entre otros (Stevenson 1982). La mayor parte del N del planeta se encuentra en las rocas ígneas de la corteza y el manto; sin embargo, una fuente importante de reserva es la atmósfera en la cual el 78% es N_2 , una forma inerte de N, que debe ser fijado por microorganismos especializados antes de ser incorporado a la materia orgánica, por lo tanto, su ciclado es fundamental para la biogeoquímica de la Tierra.

El N es clave para el mantenimiento de los ecosistemas y la disponibilidad de los diferentes compuestos nitrogenados depende de los procesos microbiológicos que lo regulan, los cuales involucran una serie de reacciones de óxido-reducción asociadas generalmente con sistemas de transporte de electrones. En las etapas de transformaciones inorgánicas del nitrógeno, el ciclo incluye la reducción del nitrógeno molecular (N_2) presente en la atmósfera a amonio (NH_4^+), el primer compuesto biológicamente disponible en el ciclo. Las etapas posteriores involucran la oxidación de amonio a nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) y posteriormente la reducción de estos compuestos a los correspondientes óxidos de nitrógeno, finalizando el ciclo con la producción de N_2 (Figura 1) (Fowler et al. 2013). Cabe destacar que no todo el amonio presente en el suelo proviene de la fijación de nitrógeno atmosférico, gran parte del amonio proviene de la mineralización del N-orgánico, donde una gran variedad de microorganismos no especializados, como bacterias y hongos

heterótrofos descomponen proteínas en aminoácidos, aminas y urea, para ser finalmente convertidos en amonio (Johnson et al. 2005, Gilmour 2011).

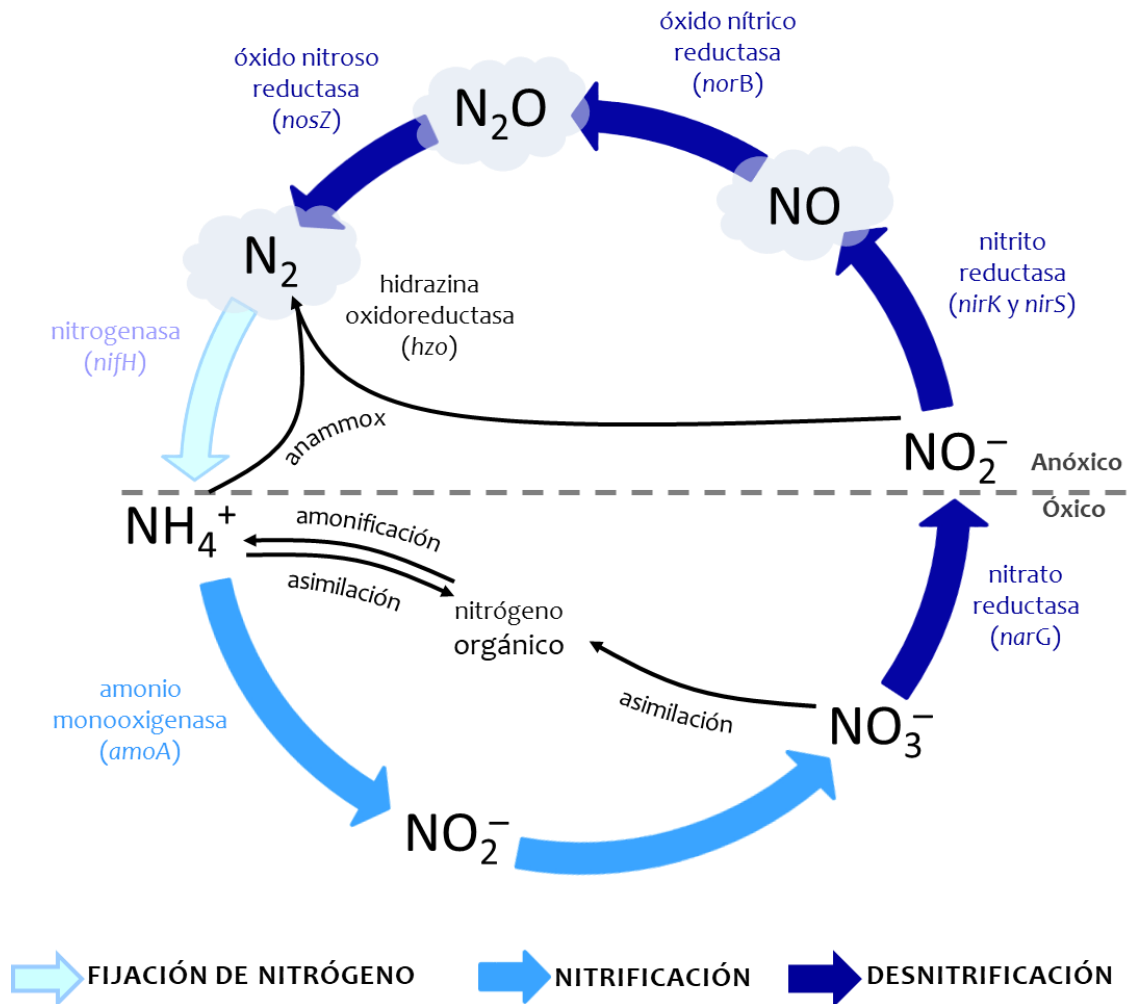


Figura 1 Ciclo del Nitrógeno.

En el esquema se muestran los procesos del ciclo, destacando los genes que se usan en este trabajo como marcadores moleculares de los grupos funcionales claves. Fijación de Nitrógeno (diazótrofos, gen *nifH*). Nitrificación (oxidadores de amonio, gen *amoA*). Desnitrificación (reductores de nitrato, gen *narG*; de nitrito, *nirK/nirS*; de óxido nítrico, *norB* y de óxido nitroso, gen *nosZ*).

La biogeoquímica del nitrógeno depende casi por completo de reacciones de óxido-reducción, llevadas a cabo principalmente por bacterias, ya que a pesar de la gran abundancia de N_2 atmosférico, éste es inerte; por lo tanto, la fijación biológica

de nitrógeno atmosférico limita la productividad en los ecosistemas, tanto marinos como terrestres (Canfield et al. 2010). En tanto, los microorganismos son los únicos seres vivos que intervienen en todos y cada uno de los procesos que constituyen el ciclo del nitrógeno en la biosfera, de ahí la importancia de estudiarlos (Young 1992).

A nivel biogeoquímico, el conjunto de microorganismos que participan en la conversión de un compuesto en otro, son tratados como grupos funcionales o gremios más que como unidades taxonómicas (Meyer 1994, Vitousek & Hooper 1994). De los grupos funcionales microbianos que participan para llevar a cabo el ciclo del nitrógeno, se destacan las bacterias fijadoras de nitrógeno, las bacterias nitrificadoras y las bacterias desnitrificadoras, siendo normalmente utilizados como marcadores funcionales de estos gremios los genes *nifH*, *amoA*, *narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* y *nosZ*, respectivamente (Figura 1).

En más detalle, las etapas claves son:

Fijación de nitrógeno. La incorporación de nitrógeno inorgánico a los ecosistemas está limitada por el proceso de fijación biológica del nitrógeno atmosférico, el cual es realizado exclusivamente por microorganismos. Éstos poseen el sistema enzimático nitrogenasa, codificado por los genes *nif*, el cual es responsable del proceso de reducción del $N_2(0)$ a $NH_4^+(-3)$. Estos genes se encuentran altamente conservados y están presentes en muchos grupos de bacterias y arqueas filogenéticamente divergentes (Falkowski & Godfrey 2008, Godfrey & Falkowski 2009).

Nitrificación: el NH_4^+ , una vez formado, puede seguir por diferentes rutas, ya sea pasar a formar parte de moléculas orgánicas vía el proceso de asimilación o continuar con las transformaciones inorgánicas, mediante las cuales el $NH_4^+(-3)$ es oxidado en diferentes etapas hasta $NO_3^+(+5)$, siendo la primera de ellas limitante

(Nicol et al. 2008). En la primera etapa, consistente en dos sub-etapas, las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) oxidan el NH_4^+ (-3) a hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{-OH}$ (-1)) mediante la enzima amonio monooxigenasa, codificada por los genes *amo*, para que luego la hidroxilamina oxidoreductasa la oxide a NO_2^- (+3). En la segunda etapa, las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB) oxidan el NO_2^- a NO_3^- mediante la nitrito oxidoreductasa (Prosser 1990).

Desnitrificación: Para completar el ciclo, y devolver el nitrógeno a la atmósfera, el NO_3^- (+5) es reducido hasta NO_2^- (+3) por la nitrato reductasa (codificada por el gen *narG*) y posteriormente la nitrito reductasa, codificada por los genes *nir*, cataliza su reducción a óxido nítrico (NO (+2)). Esta enzima presenta dos formas estructurales, una conteniendo citocromo cd1 (codificada por el gen *nirS*) y otra asociada a cobre (codificada por el gen *nirK*); siendo la primera predominante en sedimentos marinos y la última en suelos terrestres (Braker et al. 2000; Prieme et al. 2002). Luego, el NO es reducido por la óxido nítrico reductasa (codificada por el gen *norB*), produciéndose óxido nitroso (N_2O (+1)), un gas de efecto invernadero, el cual completará el proceso de desnitrificación al ser reducido a N_2 (0) por la óxido nitroso reductasa codificada por el gen *nosZ* (Zumft 1997).

La agricultura, el uso de combustibles fósiles y otras actividades humanas han alterado el ciclo global del N, principalmente aumentando la disponibilidad y la movilidad de éste (Vitousek et al. 1997). El aumento del N en un ecosistema puede alterar el crecimiento de plantas, la química del suelo y tener impactos potencialmente importantes en las dinámicas microbianas. Sin embargo, el entendimiento de cómo este aumento afecta a los microorganismos permanece incompleto y no se sabe si ellos responden de manera similar en todos los

ecosistemas (Ramirez et al. 2012). El N puede ser almacenado por plantas y el suelo, pero también se pierde como emisiones de gas o por procesos de lixiviación, adiciones prolongadas de N pueden saturar la capacidad del ecosistema de almacenarlo (Aber et al. 1989; Lovett & Goodale 2011). Entender qué sucede con este aumento adquiere mayor importancia en la Antártica, donde se ha visto un aumento del N combinado como consecuencia de perturbaciones animales y antropogénicas; siendo las más importantes las deposiciones de animales y las actividades humanas como la quema de combustible fósil y la generación de electricidad (Galloway et al. 2008; Fowler et al. 2013).

Las zonas libres de hielo en la Antártica representan menos del 0,4% del continente (Ugolini & Bockheim 2008) y abarcan desde suelos ricos en nutrientes en las zonas costeras, a suelos oligotróficos en sitios desérticos y lugares de gran altitud. Aunque los suelos antárticos se caracterizan por ser ambientes extremos, son capaces de albergar comunidades bacterianas abundantes y diversas (Cowan et al. 2002), y una parte de ellas parecen ser únicas en la Antártica (Cowan et al. 2014).

Los suelos antárticos se caracterizan por condiciones predominantemente hostiles para la vida vegetal y animal, donde solo unas pocas plantas y animales han logrado colonizar y sobrevivir en regiones libres de hielo. Por su parte, los microorganismos son más abundantes y diversos, y se distribuyen mayoritariamente a lo largo de las zonas costeras. Estas comunidades están adaptadas localmente y varían de acuerdo con la geografía, el clima, los parámetros del suelo y las influencias biológicas (Chong et al. 2012). Además de estar sometidos a bajas temperaturas, estos suelos presentan típicamente bajos niveles de humedad (<5%), de carbono (<2%) y de nitrógeno (<2%); asimismo, el bajo contenido de arcilla les

confiere, en consecuencia, poca capacidad amortiguadora de pH (Aislabie et al. 2006). Una notable excepción son los suelos formados por influencia de colonias de animales, ya que son ricos en deposiciones animales como guano de aves y heces de mamíferos, y son generalmente ricos en nitrógeno (>10%) y carbono orgánico total (>20%) (Chong et al. 2009, Ganzert et al. 2011), lo que hace a los asentamientos animales la principal reserva de carbono y nitrógeno en los ecosistemas terrestres antárticos (Simas et al. 2007). Por lo tanto, es esencial el conocimiento de los grupos funcionales bacterianos en estos suelos y así tener una mejor comprensión del rol que ellos cumplen en la mantención del ciclo de N.

En las costas Antárticas, las deposiciones animales son un factor determinante de la composición de nutrientes del suelo. El N en suelos de asentamientos animales está presente como urea, ácido úrico, amonio y bajos niveles de nitrato (Wright 1995). Un aumento en la cantidad de N combinado se ha visto relacionado con una disminución en la abundancia de genes *nifH* (Lindsay et al. 2010). Asimismo, las colonias de pingüinos y lobos marinos producen mayores emisiones de N₂O que los suelos libres de asentamientos animales, revelando que estos suelos son zonas importantes en la emisión de este gas de efecto invernadero a la atmósfera, el cual se puede producir tanto por nitrificación como por desnitrificación (Hu et al. 2015). En particular, en un estudio con microcosmos de suelos antárticos con la adición de nitrógeno en forma de urea (simulando desechos fecales), se observó un aumento leve de la abundancia de genes relacionados con la oxidación del amonio (genes *amoA*) y un aumento de hasta el doble en la abundancia de genes relacionados con la reducción del nitrito en la desnitrificación (genes *nirS/nirK*) (Jung et al. 2011). Los altos aportes de nitrógeno pueden resultar en una saturación, donde el nutriente

excede la demanda de los organismos presentes (Aber et al. 1991), afectando los flujos de gases de efecto invernadero en estas regiones (Zhu et al. 2013).

En esta Tesis se propuso determinar la presencia y abundancia de los grupos bacterianos involucrados en procesos claves del ciclo biogeoquímico del N en suelos influenciados por asentamientos animales ubicados en el Cabo Shirreff (Isla Livingston), perteneciente a la Zona Antártica Especialmente Protegida N°149 (ZAEP N°149), la cual se caracteriza por ser un punto importante de diversidad faunística, donde aves y mamíferos marinos tienen un rol importante en el ciclo de los nutrientes. Cabe destacar que se ha determinado que los parámetros fisicoquímicos edáficos que principalmente influyen sobre la estructura de las comunidades bacterianas dominantes en suelos de la Isla Livingston (Antártica), son los niveles de carbono y nitrógeno totales y la humedad (Ganzert et al. 2011), y no el pH como sucede en suelos templados (Fierer & Jackson 2006). Esto se podría explicar porque los suelos templados son más bien ácidos y neutros mientras que los suelos áridos, como los antárticos, son más bien básicos, y son los valores de pH ácidos los que más afectan la diversidad bacteriana.

Para llevar a cabo esta propuesta de investigación, se determinaron las variables edáficas y se cuantificaron grupos bacterianos relacionados con el ciclo del N mediante la utilización de marcadores moleculares específicos en muestras ambientales de suelo antártico, contribuyendo en parte al entendimiento del funcionamiento del ciclo microbiano de nutrientes en ambientes extremos, en particular en suelos relacionados a asentamientos animales en la Antártica.

HIPÓTESIS

En las zonas costeras libres de hielo en Antártica, las deposiciones animales influyen sobre los factores fisicoquímicos del suelo, principalmente aumentando el nitrógeno disponible. Por lo tanto, se espera una mayor abundancia relativa de los genes relacionados con la nitrificación y desnitrificación en comparación a aquellos relacionados con la fijación de nitrógeno.

OBJETIVOS

Objetivo general

Relacionar la abundancia de los genes involucrados en el ciclo del nitrógeno con las variables edáficas en suelos de asentamientos de animales marinos antárticos del Cabo Shirreff (Isla Livingston).

Objetivos específicos

1. Determinar variables edáficas de los suelos de asentamientos de aves y mamíferos marinos antárticos.
2. Cuantificar los principales genes relacionados al ciclo del nitrógeno, en los suelos de asentamientos de aves y mamíferos marinos antárticos.
3. Correlacionar la cuantificación de los genes del ciclo del nitrógeno con los valores de las variables edáficas medidos en los suelos de asentamientos de aves y mamíferos marinos antárticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Las muestras de suelo se recolectaron durante la 48^a Expedición Científica Antártica (Enero 2012) en el Cabo Shirreff (62°27'30" S, 60°47'17" O), Isla Livingston, Islas Shetland del Sur, Antártica (Proyecto INACH F_02-10; IP: Julieta Orlando). El cabo Shirreff es una zona protegida situada en un área libre de hielo, en el extremo norte de la península Juan Pablo II. Fue escogido por ser un área importante para las aves ya que mantiene una gran colonia de pingüinos barbijo, también presenta colonias de pingüinos papúa, gaviotas cocineras y otras aves marinas. Pero en el sitio también se destaca la colonia de cría más grande de lobos finos antárticos en la región de la Península Antártica (ASPA 149 2016).

Para un total de 18 muestras, se recolectaron 3 muestras de suelo a una profundidad no mayor a 10 cm, desde cada uno de los 5 asentamientos de animales marinos, incluyendo aves, como gaviotas (*Larus dominicanus*, Ld) y pingüinos (*Pygoscelis antártica*, Pa; *P. papua*, Pp), y mamíferos, como elefantes marinos del sur (*Mirounga leonina*, MI) y lobos marinos antárticos (*Arctocephalus gazella*, Ag). Además, se recolectaron 3 muestras de suelo sin impacto visible de animales, presencia de deposiciones o de vegetación como controles (Ct) (Figura 2). Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

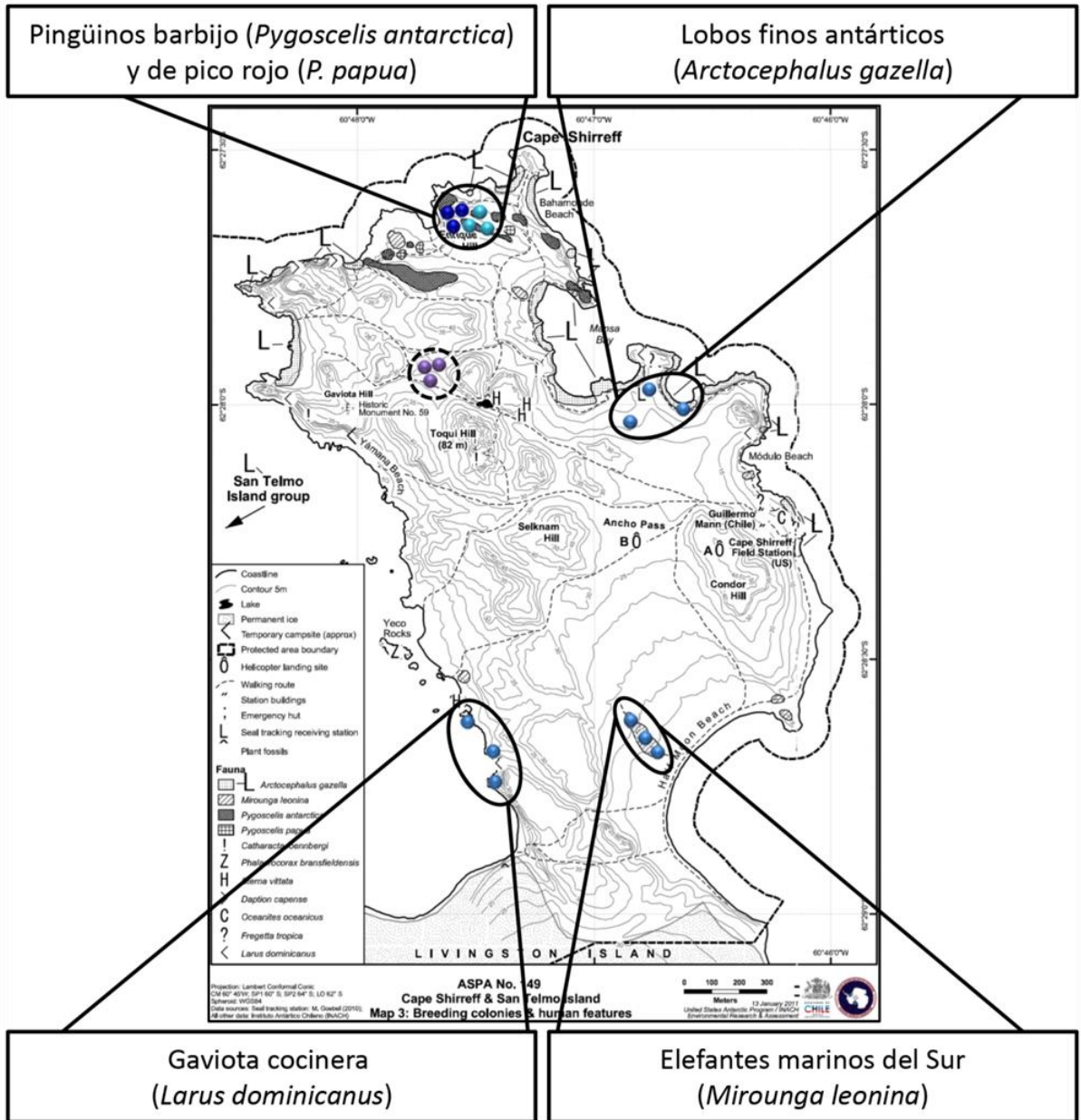


Figura 2 Sitios de muestreo en el Cabo Shirreff (Isla Livingston)

En el mapa se marcan en azul los puntos de muestreo del suelo de asentamientos animales y en violeta los suelos controles sin influencia animal ni vegetal (n=18).

Determinación de parámetros edáficos

En cada muestra se determinó el contenido hídrico, de materia orgánica, el pH, los niveles de nitrógeno en forma de amonio y nitrato, el contenido de fósforo y la conductividad. Para las diferentes mediciones, se aplicaron los siguientes métodos ya estandarizados, con excepción del contenido de fósforo y la conductividad que debieron ser estandarizados:

El contenido hídrico (CH) se determinó gravimétricamente (Steubing et al. 2002). Para ello se pesó 1 g de suelo (peso húmedo, PH) y se secó a 65°C durante 24 h hasta obtener un peso constante (peso seco, PS). El porcentaje de CH se obtuvo de acuerdo con la fórmula:

$$CH = \frac{PH - PS}{PS} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de humedad.

El contenido de materia orgánica (MO), se determinó a partir de las muestras secas que fueron calcinadas a 400°C durante 16 h y se determinó el peso calcinado (PC), el cuál fue multiplicado por un factor de 0,8 (Sadzawka et al. 2006) para así obtener la materia orgánica (MO) de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Pérdida por calcinación \%} = \frac{PS - PC}{PS} \times 100$$

$$MO \% = \text{Pérdida por calcinación} \times 0,8$$

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de materia orgánica.

El pH se determinó potenciométricamente a partir de extractos en una proporción 1:10 suelo/agua utilizando un electrodo de pH conectado a un peachímetro pH 500 (Oakton).

El contenido de nitrógeno del amonio (N-NH_4^+) se determinó utilizando extractos de 1 g de suelo en 10 ml de agua y un electrodo ión selectivo de NH_4^+ conectado a un medidor Ion 510 (Oakton) (Steubing et al. 2002). El contenido de nitrógeno del nitrato (N-NO_3^-) se determinó por el método colorimétrico propuesto por Yang et al. (1998) a partir de 1 g de suelo.

El contenido de fósforo (P) se determinó mediante la extracción de Bray 1 (Bray & Kurtz 1945) y se detectó por la generación de azul de fosfomolibdato ($[\text{PO}_4\text{12MoO}_3]^{3-}$) (Murphy & Riley 1962). Previo a la medición de fósforo en las muestras de suelos, se procedió a optimizar el método Bray 1 de extracción debido a que no estaba validada esta metodología en el laboratorio. En este método la extracción de fósforo se realizó con fluoruro de amonio (NH_4F) en ácido clorhídrico (HCl) para luego detectar los fosfatos generados con solución de molibdato de amonio, ácido ascórbico y antimonio, generando el azul de fosfomolibdeno. Finalmente se midió su absorbancia a 882 nm (Murphy & Riley 1962). Las muestras se secaron en horno a 60°C por 16 h y la extracción se realizó a partir de 1 g de peso seco, con 7 ml de extractante de Bray 1 (NH_4F 0,03 N y HCl 0,025 N), y se agitó vigorosamente por 5 min a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo de extracción, se centrifugó a 5500 rpm durante 5 min para obtener el sobrenadante clarificado. La detección de fosfato se realizó agregando 0,5 ml de sobrenadante en 2 ml del reactivo de coloración ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $9,8\times 10^{-7}$ M; $\text{KSbO}\cdot\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ $8,4\times 10^{-8}$ M; L-ácido ascórbico 0,006 M; H_2SO_4 1,4%), se agitó con vortex y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, esperando la estabilidad del complejo azul, antes de medir. Para cuantificar el fosfato se realizó previamente una curva de calibración desde 0,05 hasta 1 $\mu\text{g/ml}$ de fosfato (KH_2PO_4) y se determinó que la zona lineal de la

curva, antes de la saturación de absorbancia (alrededor de 0.6), correspondió a 0,85 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3), por lo que toda muestra que superaba dicha absorbancia fue diluida hasta lograr una absorbancia adecuada.

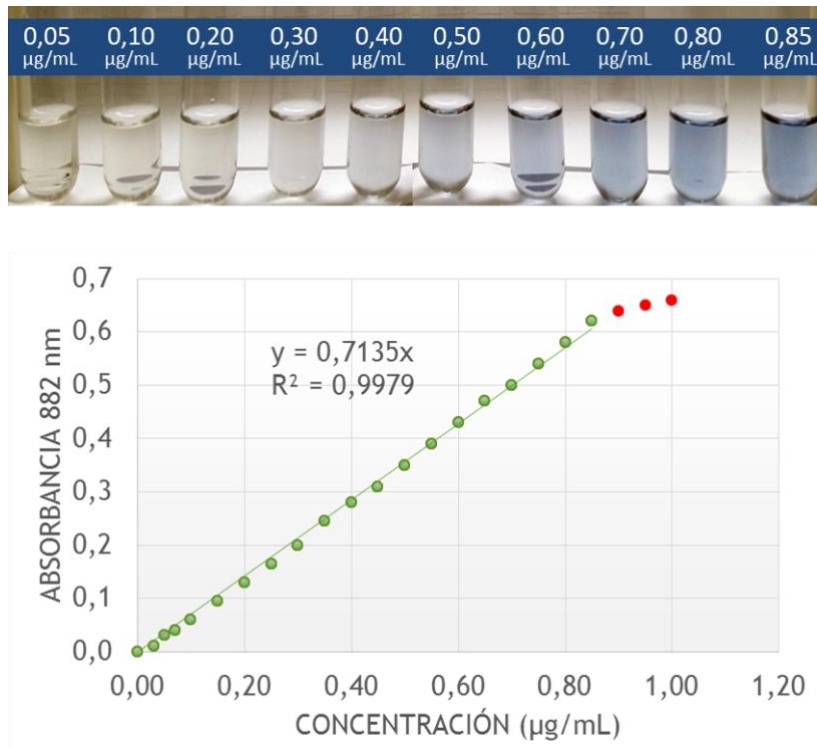


Figura 3 Curva de calibración de fósforo

Curva de calibración de la medición de fósforo mediante el método de Bray I. Los puntos en verde están dentro del rango lineal (0,05 $\mu\text{g/mL}$ – 0,85 $\mu\text{g/mL}$), los puntos en rojo indican el nivel de saturación. En el gráfico se indican los parámetros de ajustes de la recta. En el panel superior se muestran las diluciones del estándar de KH_2PO_4 , indicándose las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$.

La conductividad se midió con un conductímetro de mesa de la serie DDS-W (Bante Instruments) y también debió ser estandarizada. Para ello, se resuspendió 1 g de suelo en 5 ml de agua desionizada (relación 1:5), se agitaron y se filtraron (Roser et al. 1993). Para calibrar el equipo, se prepararon soluciones de KCl, a las cuales se les midió la conductividad y así obtener la constante de la celda. Como la constante

de la celda promedio para las soluciones no difirió en más de un 5% del valor dado por el fabricante del equipo (valor dado: 1,007; valor calculado: 1,055; diferencia 4,8%), se ajustó a ese valor la constante de la celda del conductivímetro (Sadzawka et al. 2006). Los resultados se expresaron en microsiemens por centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

Extracción de DNA del suelo

El DNA genómico se extrajo a partir de 0,25 g de suelo para cada una de las 18 muestras utilizando el kit “PowerSoil DNA Isolation” (MoBio Laboratories Inc.), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras de DNA se almacenaron en tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8,0) a -20°C , hasta su posterior análisis. La concentración y calidad del DNA se realizó utilizando un equipo espectrofotómetro de multiplaca Epoch Micro-Volume (Biotek) con el programa Gen5. Para verificar la calidad e integridad del DNA genómico obtenido y descartar posibles inhibiciones en las amplificaciones, causadas por la presencia de alguna sustancia húmica co-extraída, se realizó un PCR del gen del rRNA 16S con los partidores A17F (5'-GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 519R (5'-GTA TTA CCG CGG CAG CTG GCA C-3') (Kumar et al. 2003) y los amplicones se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa. Todas las electroforesis en gel de agarosa fueron realizadas al 1,2% (p/v) en tampón TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA [pH 8,0]) a voltaje constante (80 V). Los geles teñidos con GelRed™ (Biotium) se revelaron usando un transiluminador UV.

Clonación

Las abundancias de los genes se determinaron por cuantificación absoluta mediante PCR en tiempo real. Para ello se realizó una curva de calibración para cada gen. Con el objetivo de realizar las curvas de calibración, fue necesario crear una genoteca de cada uno de los genes a cuantificar, a fin de tener plasmidios con los genes de interés que se usarían como molde para las amplificaciones correspondientes. Para ello, primero se amplificaron los genes *nifH*, *amoA*, *narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* y *nosZ* mediante PCR de punto final a partir del DNA extraído desde las muestras de suelo. La amplificación de los genes del ciclo del nitrógeno se realizó utilizando los partidores descritos en la tabla 1.

Tabla 1. Partidores funcionales Partidores utilizados en la cuantificación de genes del ciclo del nitrógeno.

Gen blanco (cepa de referencia)	Partidor	Secuencia del partidor (5'-3')	Tamaño (pb)
Nitrogenasa; <i>nifH</i> (<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501)	nifHF	AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC	457 (1)
	nifHR	TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT	
Amonio monooxigenasa; <i>amoA</i> (<i>Nitrosomonas europaea</i>)	amoA1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	491 (2)
	amoA2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	
Nitrato reductasa; <i>narG</i> (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)	narG-f	TCG CCS ATY CCG GCS ATG TC	173 (3)
	narG-r	GAG TTG TAC CAG TCR GCS GAY TCS G	
Nitrito reductasa; <i>nirK</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58)	nirK1F	GGM ATG GTK CCS TGG CA	514 (4)
	nirK5R	GCC TCG ATC AGR TTR TGG	
Nitrito reductasa; <i>nirS</i> (<i>Ralstonia eutropha</i> H16)	cd3aF	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	425 (5)
	R3cd	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A	
Óxido nítrico reductasa; <i>norB</i> (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)	cnorBF	GAC AAG NNN TAC TGG TGG T	389 (6)
	cnorBR	GAA NCC CCA NAC NCC NGC	
Óxido nitroso reductasa; <i>nosZ</i> (<i>Paracoccus denitrificans</i>)	nosZFb	AAC GCC TAY ACS ACS CTG TTC	750 (1)
	nosZRb	TCC ATG TGC AGN GCR TGG CAG AA	

(1) Rösch & Bothe 2005. (2) Rotthauwe et al. 1997. (3) Bru et al. 2007. (4) Braker et al. 1998. (5) Throbäck, 2004. (6) Braker & Tiedje 2003.

Las mezclas de reacción se prepararon utilizando GoTaq® Green Master Mix (GoTaq® DNA polimerasa en tampón de reacción Green GoTaq® [pH 8.5], 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM) (Promega) y las amplificaciones se llevaron a cabo en un termocilador Maxygene II (Axygen) de acuerdo con los programas descritos en la tabla 2. La integridad y calidad de los amplicones se determinaron electroforéticamente mediante geles de agarosa.

Tabla 2. Programas PCR. Programa de PCR para cada gen del ciclo del nitrógeno. Se muestran las condiciones utilizadas en las amplificaciones de PCR de punto final y PCR en tiempo real.

Gen	Di		D		H		E		Ef	
	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)
<i>nifH</i> ^b	94	15	94	1	50	1	72	1	72	10
<i>amoA</i>	94	5	94	0,75	60	1	72	1	72	20
<i>narG</i>	94	5	95	0,5	56	0,5	72	1	72	5
<i>nirK</i>	94	3	94	0,5	57	0,5	72	0,67	72	10
<i>nirS</i>	94	2	94	0,5	57	1	72	1	72	10
<i>norB</i>	94	5	95	0,5	53	0,67	72	0,5	72	10
<i>nosZ</i>	94	2	94	0,5	53	1	72	1	72	10

Todas las amplificaciones se realizaron con 40 ciclos. Di: desnaturalización inicial; D: desnaturalización; H: hibridación; E: elongación; Ef: elongación final; T: temperatura en °C; t: tiempo en minutos.

^b Para el gen *nifH*, los primeros 15 ciclos de amplificación se comenzaron a 65°C con disminución de la temperatura de 1°C por ciclo.

Los productos de PCR se purificaron usando el kit UltraClean PCR Clean-up (MoBio Lab. Inc.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La concentración de los fragmentos purificados se cuantificó a partir de una imagen del gel de agarosa usando como referencia la banda de 500 pb del estándar de DNA GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific) en el programa Image J (Schneider et al. 2012). Este resultado se utilizó para calcular la cantidad de inserto a utilizar en la ligación del vector de acuerdo con la expresión:

$$y_{(\mu\text{g de fragmento})} = 0,00018 * x_{(\text{pb de fragmento})}$$

Ecuación 3. Cálculo de la cantidad de fragmento a ligar en el vector pTZ5R/T.

Para clonar se usó el vector pTZ5R/T o el vector pGEM-T con el kit de clonación InsTAclone™ PCR Cloning (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante y los resultados de la ligación se corroboraron

mediante PCR utilizando los partidores universales M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') y M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Los productos de ligación se usaron en la transformación de células competentes de *Escherichia coli* JM107 utilizando el kit de clonación TransformAid™ Bacterial Transformation (Thermo Scientific) 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-D-galactopiranosido) en presencia de IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido). La presencia del inserto esperado se determinó por PCR utilizando los partidores M13F y M13R utilizando como molde DNA obtenido por lisis de las colonias seleccionadas que se resuspendieron en 10 µl de amortiguador TE, y se aplicaron 8 ciclos sucesivos de choques térmicos de 1 min a 98°C y 1 min 4°C. Finalmente, la extracción del plasmidio recombinante se realizó con el kit AxyPrep Plasmid Miniprep (Axygen Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de un cultivo de toda la noche de las colonias de bacterias transformadas exitosamente.

Cuantificación de genes mediante qPCR

En la estandarización de las curvas de calibración se realizaron diluciones del plasmidio con el gen blanco donde cada dilución corresponde a un punto de la curva estándar. Se realizaron diluciones del plasmidio hasta que la banda que corresponde al producto de amplificación de cada gen no se observa en el gel. Para esto se hicieron diluciones seriadas del DNA plasmidial que contiene cada gen en los rangos

de 1:20 hasta 1:4 a fin de obtener entre 6 a 8 puntos de estándar para cada curva. Cada serie de diluciones se realizó a partir de 10 o 1 ng/μl de DNA plasmidial que fueron preparadas en el momento. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μl y en cada serie se usó 1μl de cada dilución del plasmidio como DNA molde para las reacciones de PCR. Todas las amplificaciones por PCR, ya sea de punto final o PCR en tiempo real, se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa para corroborar el tamaño del amplicón.

Algunas amplificaciones de las muestras de suelo presentaron bandas inespecíficas, por lo que fue necesario optimizar las concentraciones y/o diluciones adecuadas de molde para cada gen, así como el uso de aditivos (Farell & Alexandre 2012). Las condiciones de mezclas de reacción optimizadas para cada uno de los genes se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Mezclas de reacción PCR. Mezclas de reacción para la amplificación de los genes del ciclo del nitrógeno.

Reactivos	Concentración final en el medio de reacción						
	<i>nifH</i>	<i>amoA</i>	<i>narG</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>norB</i>	<i>nosZ</i>
Master Mix (2X)	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
Partidor F (μM)	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
Partidor R (μM)	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
BSA (μg/μL)	1	-	0,5	0,25	0,25	0,5	-
DMSO (%)	5	-	-	-	-	5	-
Formamida (%)	-	-	-	-	-	-	1,25

Para el PCR de punto final se utilizó GoTaq® Green Master Mix y 25 μl de reacción. Para el PCR en tiempo real se utilizó GoTaq® qPCR Master Mix y 20 μl de reacción. BSA: albúmina de suero bovino; DMSO: dimetilsulfóxido.

A partir de las concentraciones iniciales de cada plasmidio, se realizó una conversión de ng/μl de DNA a copias/μl, para la posterior cuantificación mediante

qPCR del número de copias de los respectivos genes. El cálculo para cada gen se determinó usando la expresión:

$$N_{copias} = \frac{ng \times 6,022 \times 10^{23}}{pb \times 10^9 \times 660}$$

Ecuación 4. Cálculo del número de copias de cada gen.

Todas las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron usando GoTaq® Real Time qPCR Master Mix y SYBR Green para la detección (Promega) en el equipo Mx3000P Real-Time PCR System (Stratagene). El análisis de la cuantificación por qPCR se realizó utilizando el programa MxPro QPCR (Agilent Genomics), con el cual se obtuvieron los gráficos del ciclo umbral (Ct) versus el logaritmo decimal del número de copias en las diluciones. En esta relación inversa, a mayor concentración inicial el umbral de fluorescencia es superado antes (ciclo más bajo). Con estos parámetros y mediante una regresión lineal se construye la curva de calibración, obteniéndose una ecuación para cada gen donde la concentración inicial está expresada en número de copias del gen.

$$Ct = -m(\log_{10} copias) + n$$

Ecuación 5. Cálculo del porcentaje de eficiencia de la amplificación por qPCR.

El número de copias del gen cuantificado se determinó interpolando los ciclos determinados para cada muestra en la curva de calibración obtenida mediante regresión lineal y de acuerdo con el umbral de fluorescencia definido previamente para la misma curva. La plataforma MxPro también entrega el coeficiente de determinación (R^2) y la eficiencia de cada curva de calibración determinada a partir

de la pendiente de la curva. La eficiencia de cada curva de calibración se calculó de acuerdo con la expresión:

$$Eff(\%) = \left(10^{\frac{1}{pendiente}} - 1 \right) \times 100$$

Ecuación 6. Cálculo del porcentaje de eficiencia de la amplificación por qPCR.

La especificidad de los fragmentos amplificados fue confirmada por la curva de disociación (ver anexo) y el tamaño del fragmento esperado mediante electroforesis en agarosa. Tanto las curvas de calibración como las cuantificaciones de los genes se realizaron en duplicado. La curva estándar utilizada se realizó en conjunto con la cuantificación de las muestras y procurando que las eficiencias de las curvas estuviesen en un rango de 90 a 110% de eficiencia. Para determinar la abundancia de los genes en los distintos suelos estudiados, se utilizó siempre 1 µl de DNA extraído y los resultados se expresaron en número de copias iniciales del gen por cada gramo de suelo (copias gen/g de suelo).

Análisis de datos y relaciones

La cuantificación de los genes se analizó directamente en la plataforma Mx3000P Real-Time PCR System (Stratagene) obteniéndose valores de copias/µl, las cuales luego fueron transformadas a copias/g suelo.

Las diferencias estadísticamente significativas de las variables edáficas, y de las abundancias absolutas obtenidas de cada gen, se compararon entre los suelos de asentamientos animales y los suelos control, estas diferencias fueron determinadas mediante intervalos de confianza del 95% que no se superpusieron

después de 10.000 muestreos aleatorios, usando el “*boot*” pack en R v3.4.4 (<http://www.r-project.org>).

Posteriormente, y con el objetivo de determinar la existencia de una relación entre el número de copias de los genes y las variables edáficas determinadas, se obtuvo la regresión lineal entre el número de copias de cada gen (variable dependiente) con cada una de las variables edáficas (variable independiente). Los análisis de regresión lineal se realizaron utilizando la plataforma GraphPad Prism v6 para Windows (GraphPad Software, www.graphpad.com).

RESULTADOS

Determinación de los parámetros edáficos

Los valores de CH y MO de los 5 suelos de asentamientos animales no presentaron diferencias estadísticamente significativas al ser comparados con el suelo control (Ct), los parámetros restantes sí presentaron diferencias significativas entre los suelos controles y los de asentamientos animales (Figura 4). Los niveles de N-NO_3^- , N-NH_4^+ y P, aunque siempre fueron más altos que en el control, solo mostraron diferencias significativas al comparar las pingüineras (Pa y/o Pp) con el control. En cambio, para la CE, a excepción de los suelos de lobos finos antártico (Ag), todos los suelos mostraron diferencias significativas respecto al control.

El pH de los suelos resultó ser levemente ácido, con valores entre 5,2 y 6,8. Los suelos de las loberas y de una pingüinera presentaron un pH significativamente menor con en comparación con el suelo control y los otros suelos presentaron un pH mayor, aunque no fue significativo.

Los mayores niveles de humedad corresponden a los suelos de pingüineras (Pa y Pp), alrededor del 20% y a las loberas (Ag) los menores niveles de humedad con 6,9%. Sin embargo, al comparar con el contenido hídrico del suelo control (CH 17%), no hay diferencias significativas.

En el caso de la materia orgánica, aunque presentó mayor variación, entre 6,8% y 32%, donde el menor porcentaje fue en los suelos de las elefanteras (MI) y el mayor, lo presentaron las pingüineras (Pa y Pp).

Los valores de N-NO_3^- oscilaron entre 49,6 $\mu\text{g/g}$ en el suelo control, hasta 484 $\mu\text{g/g}$ en pingüineras, teniendo al menos 4,5 veces más nitrato los suelos ocupados

por animales, excepto con las loberas (Ag) donde no hay diferencia significativa. Los suelos de gaviotas, elefanteras y ambas pingüíneras (MI, Ld, Pa, Pp) sí mostraron diferencias significativas al compararlos con el suelo control, y todos presentan niveles más altos de nitrato que el control.

El N-NH_4^+ varió desde 6,9 $\mu\text{g/g}$ en el suelo control hasta 753 $\mu\text{g/g}$ en una de las pingüíneras (Pa), aunque todos los suelos de asentamientos animales presentaron valores más altos de amonio que el suelo control, solo son significativamente mayores en los suelos de elefanteras y pingüíneras.

El contenido de fósforo en los suelos también fue determinado ya que, junto con el nitrógeno, el fósforo es un macronutriente importante de los suelos. Para el P-Bray los suelos presentaron niveles 3 a 30 veces más altos que el suelo control. Con valores que están entre 16 $\mu\text{g/g}$ en el suelo control y 608 $\mu\text{g/g}$ en suelo de pingüíneras. Los suelos de elefanteras (MI), y ambas pingüíneras (Pa y Pp) tienen niveles significativamente más altos de fósforo que los suelos control.

Finalmente, se midieron las conductividades eléctricas de los suelos las cuales presentaron valores entre 176 $\mu\text{S/cm}$ y 2400 $\mu\text{S/cm}$, hasta 13 veces mayores que en los suelos control. La conductividad eléctrica en los suelos fue más alta en suelos de asentamientos animales donde todos resultaron ser significativamente mayores al suelo control.

La composición de nutrientes en suelos de lobos finos (Ag) y gaviotas (Ld) fue más similar a la de los suelos control. Los suelos que presentaron más diferencias en la composición de los nutrientes del suelo, con respecto al control, corresponden a suelos de colonias de elefantes marinos (MI) y de pingüinos (Pa y Pp). Para la

mayoría de los parámetros, en general, son los suelos de las pingüíneras aquellos que presentan los niveles más altos de cada parámetro medido.

Extracción de DNA

A partir de las muestras de suelo se obtuvieron 40 μl de eluido con concentraciones de DNA entre 1,5 $\mu\text{g/g}$ hasta 8,2 $\mu\text{g/g}$. La relación 260/280 de todas las muestras presenta valores por sobre 1,8 indicando que las muestras de DNA purificadas no están contaminadas con proteínas. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 4, donde se puede ver que las extracciones no presentaron diferencias significativas entre los suelos de los distintos asentamientos al compararlos con el control.

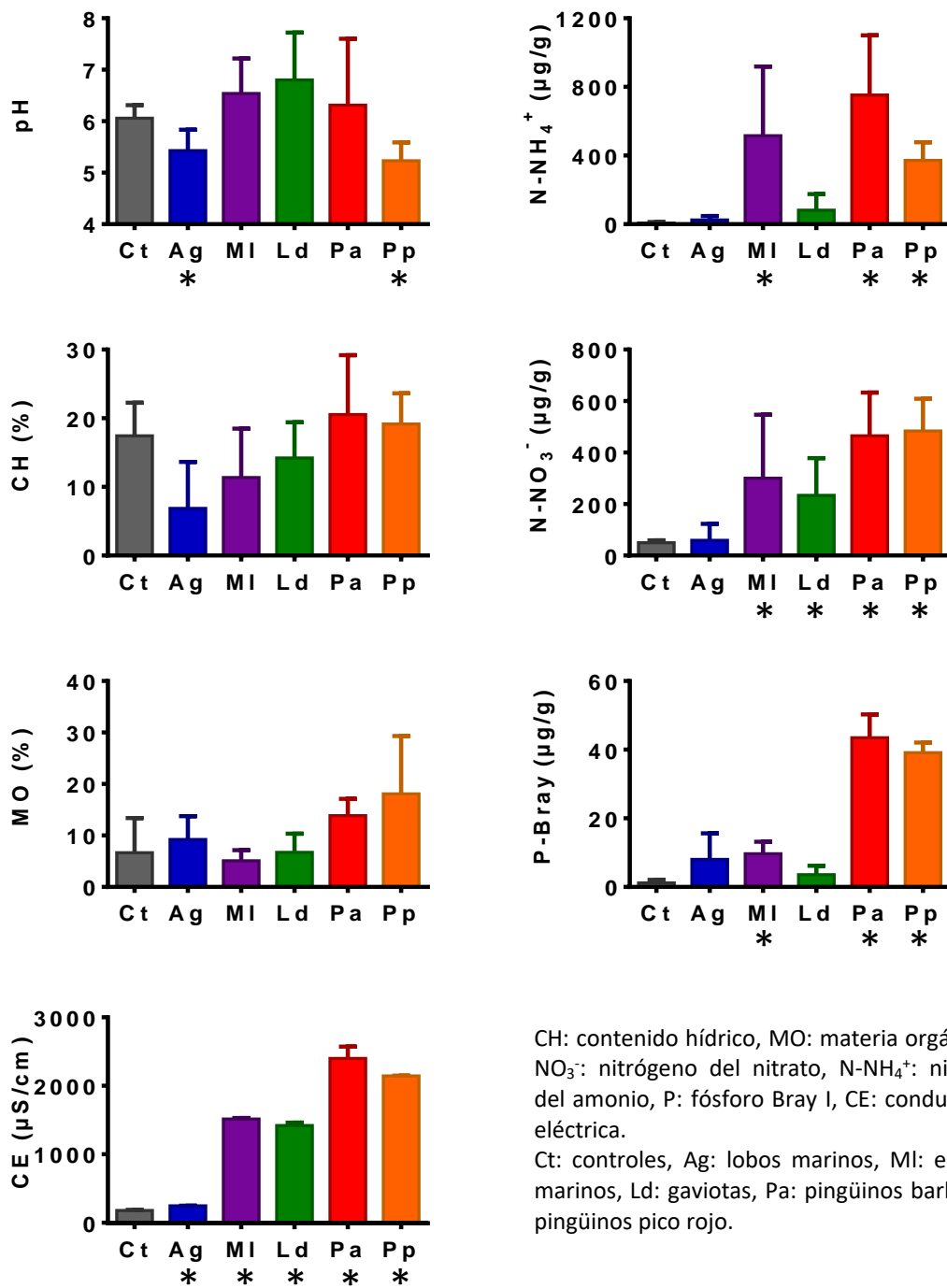


Figura 4. Parámetros edáficos. Se muestran los valores promedio + error estándar. Los valores significativamente diferentes con respecto al control se señalan con un asterisco (intervalos de confianza del 95% no superpuestos).

Tabla 4. Concentración del DNA extraído. Concentración de DNA promedio \pm error estándar y la pureza de la muestra definida como la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm.

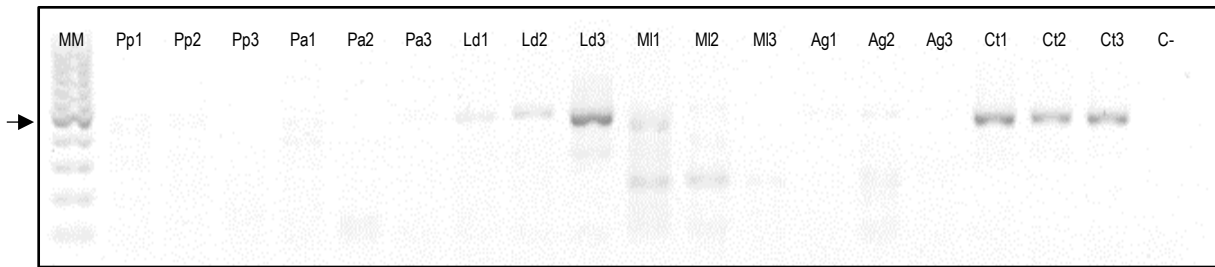
Muestras	[DNA] ($\mu\text{g/g}$ suelo) 260/280	
Controles (Ct)	1,9 \pm 0,5	a 2,1
Lobos marinos (Ag)	1,5 \pm 0,5	a 1,9
Elefantes marinos (MI)	7,1 \pm 2,5	a 1,9
Gaviotas (Ld)	3,3 \pm 0,9	a 2,0
Pingüinos barbijo (Pa)	8,2 \pm 4,0	a 1,9
Pingüinos pico rojo (Pp)	4,7 \pm 1,3	a 2,0

Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias significativas (ANOVA de una vía - postest de Tukey).

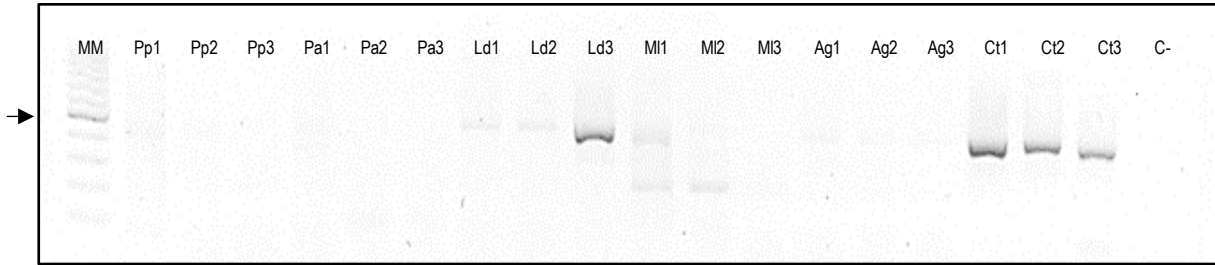
Estandarización y clonación

Se usaron aditivos para obtener bandas únicas y específicas durante las amplificaciones principalmente para optimizar las cuantificaciones por qPCR. Mediante la utilización de aditivos como BSA (albúmina de suero bovino) que estabiliza la Taq polimerasa y disminuye la interferencia por contaminantes del suelo (ej ácidos húmicos). También fue necesario el uso de DMSO (dimetilsulfóxido y formamida para reducir la formación de estructuras secundarias en templados con alto contenido GC, y disminuir las amplificaciones inespecíficas. Además, para el caso de *nifH* se mejoró aplicando, además, una estrategia de amplificación con temperaturas decrecientes durante los primeros ciclos (*touchdown*) (Figura 5). Las concentraciones finales en el medio de reacción se muestran en la tabla 3. Como ejemplo se presenta la estandarización para el gen *nifH* que presentó múltiples bandas. Una vez estandarizadas las mezclas de reacción y las temperaturas de amplificación, se realizaron las clonaciones de los genes amplificados en plasmidios para utilizarlos en las curvas de calibración.

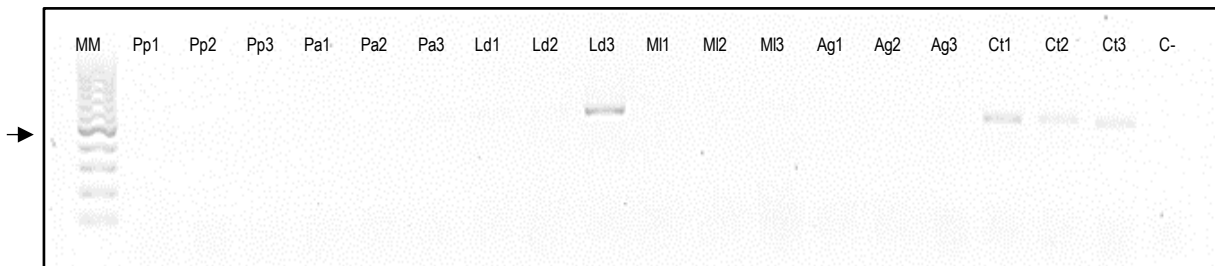
A. *nifH* asentamientos animales. Sin aditivos.



B. *nifH* asentamientos animales (dilución 1:5). BSA 1 µg/µl.



C. *nifH* asentamientos animales (dilución 1:5). BSA 1 µg/µl y DMSO 1%.



D. *nifH* asentamientos animales (dilución 1:5). BSA 1 µg/µl. Touchdown.

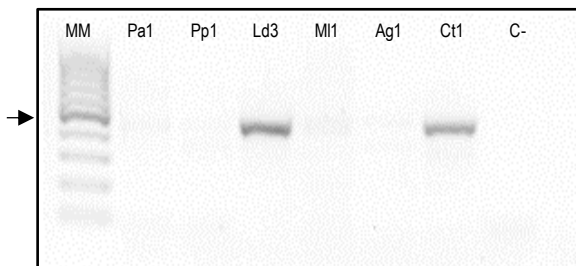


Figura 5. Resultados de las amplificaciones por PCR con diferentes aditivos y estrategias.

Se muestran los resultados de las diferentes estrategias de amplificación con uso de aditivos para el gen *nifH*. Para (A), (B) y (C) las amplificaciones se realizaron a temperatura constante de hibridación (57 °C), en (D) se utilizó el programa con *touchdown* en los 15 primeros ciclos. MM 100bp, la banda más intensa (flecha) corresponde a 500 pb. Ct: controles, Ag: lobos marinos, MI: elefantes marinos, Ld: gaviotas, Pa: pingüinos barbijo, Pp: pingüinos pico rojo, C-: control negativo de la amplificación.

Curvas de calibración

Para obtener la concentración inicial adecuada para los puntos de la curva de calibración, se realizaron amplificaciones por PCR convencional utilizando diferentes diluciones seriadas de los plasmidios que contienen los genes de interés (Ver Materiales y métodos). En la figura 6 se puede ver cómo algunos genes requieren mayores diluciones que otros; así los genes *amoA* y *nosZ* requieren diluciones seriadas de 1:20 y 1:10, respectivamente, mientras que los genes *nifH*, *narG* y *nirK* requieren diluciones máximas de 1:4 y 1:5.

En la figura 7 se muestran las curvas de calibración obtenidas para cada uno de los genes estudiados. Se observa una relación lineal entre el ciclo umbral y el logaritmo de la concentración inicial. La mayoría de las curvas de calibración para de los diferentes genes estudiados presentaron eficiencias sobre el 80% y R^2 sobre los 0,98, y fue *norB* con un 63% (R^2 0,993), la curva con la menor eficiencia. La concentración inicial del gen en cada punto de la curva de calibración se expresa como número de copias del gen/ μ l (Ecuación 4).

La relación obtenida en las curvas de calibración es inversamente proporcional, es decir, que cuanto mayor sea el número de copias iniciales del gen, menor será el ciclo umbral (Ct). De esta forma, es posible obtener una ecuación a partir de la regresión lineal del $\log(\#copias)$ versus Ct dado por la curva estándar, ésta permite calcular la concentración inicial del gen en cada muestra de suelo de acuerdo con el ciclo umbral.

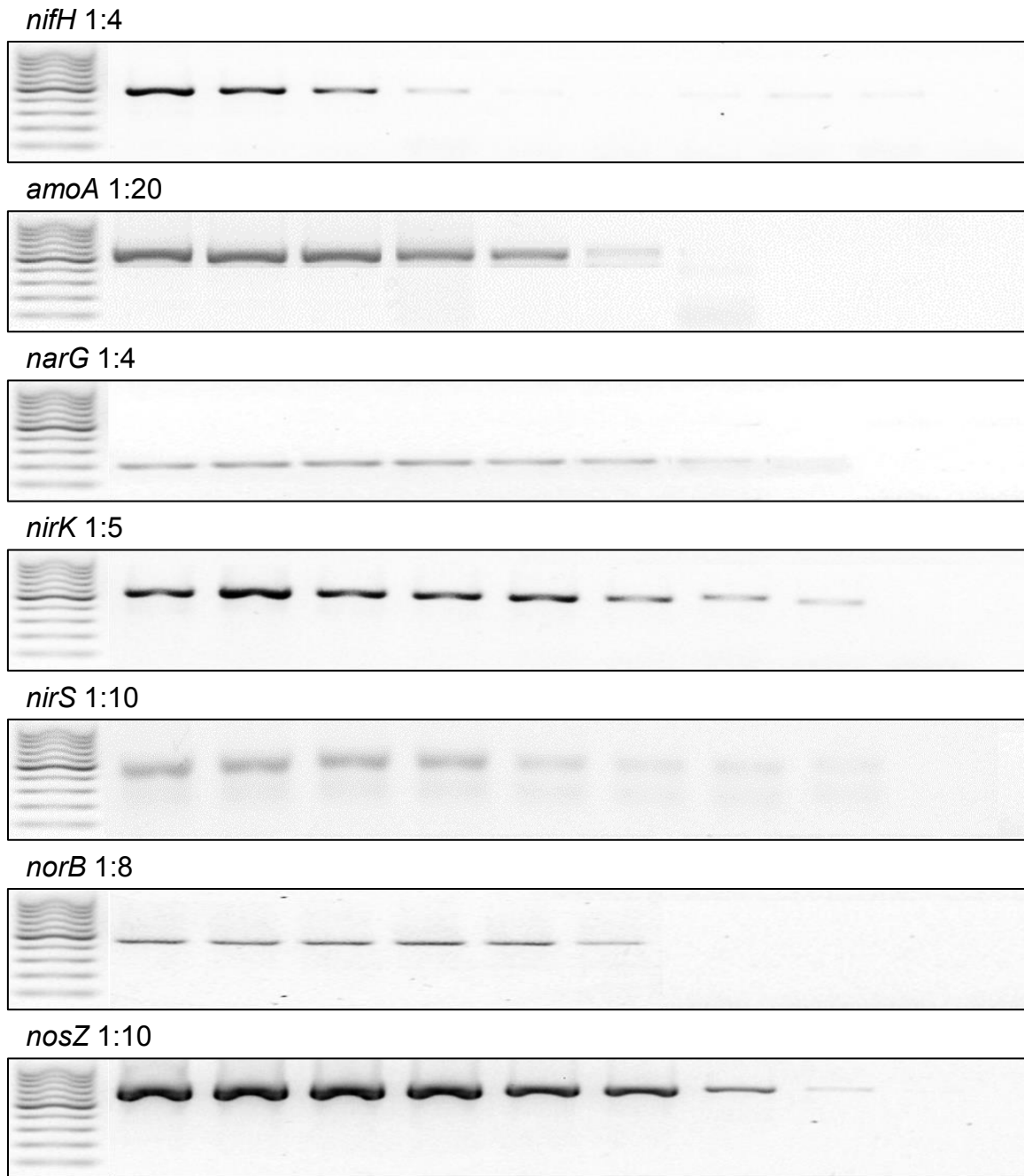


Figura 6. Diluciones seriadas para las curvas estándar de cada gen.

Amplificaciones para obtener las curvas de calibración de los genes del ciclo del nitrógeno. Se presentan los resultados de las amplificaciones de las respectivas diluciones comenzando con 10 ng/μl de DNA genómico. MM 100 bp, la banda más intensa corresponde a 500 pb. Marcadores fijación de nitrógeno, *nifH*; marcador nitrificación, *amoA*; marcadores desnitrificación: *narG*, *nirK*, *nirS*, *norB*, *nosZ*.

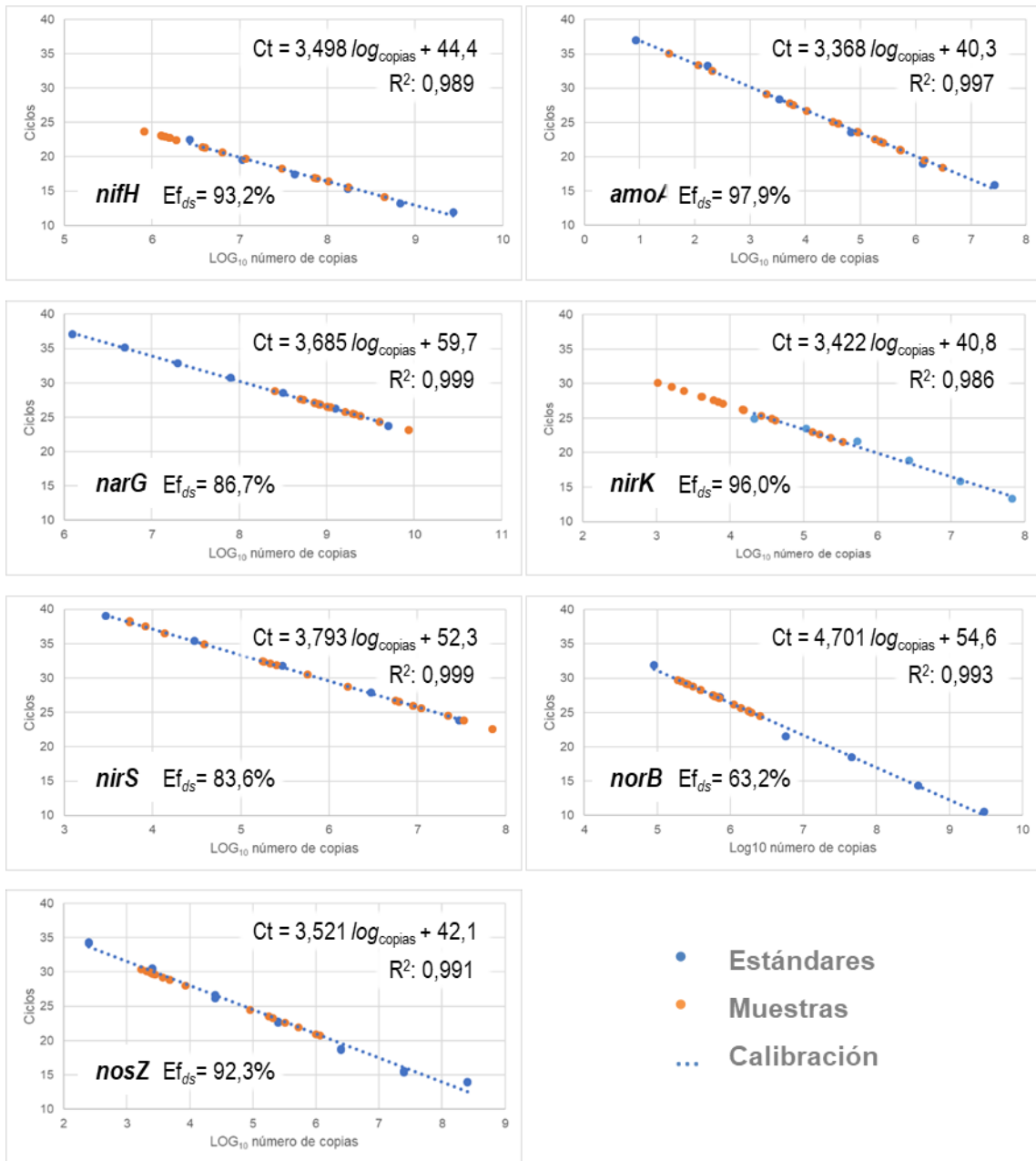


Figura 7. Curvas y eficiencia de amplificación.

Curvas y eficiencia (E_{fs}) de amplificación por PCR en tiempo real estimada a partir de diluciones en serie en base al método de curva estándar. Ct, ciclos de amplificación. *nifH*: marcador molecular de la fijación de nitrógeno; *amoA*: marcador molecular de la nitrificación; *narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* y *nosZ*: marcadores moleculares de la desnitrificación.

El número de copias iniciales del gen cuantificado se determinó interpolando en la curva de calibración los ciclos determinados para cada muestra, de acuerdo con el umbral definido previamente por la curva estándar. Por ejemplo, para *nifH* la curva está representada por:

$$Ct = -m(\log_{10} copias) + n$$

$$Ct = -3,498(\log_{10} copias) + 44,401$$

$$\log_{10} copias = \frac{44,401 - Ct}{3,498}$$

$$10^{\frac{44,401 - Ct}{3,498}}$$

Ecuación 7. Cálculo del número de copias de *nifH* a partir de la curva estándar. Ct: ciclo umbral, *m*: pendiente, *n*: coeficiente de posición.

Abundancia de genes funcionales

De las abundancias determinadas, *nirK* y *nosZ* son los genes menos abundantes, y *narG* el gen más abundante. En la figura 8, se pueden ver las abundancias absolutas por gramo de suelo de los genes, obtenidas para los diferentes de suelos influenciados por animales y suelo control.

La abundancia de *nifH* fue significativamente menor a los suelos control solo en aquellos suelos de asentamientos de mamíferos marinos (lobos marinos, Ag; y elefantes marinos, MI) con diferencias de casi dos órdenes de magnitud (Ver anexo 9). los otros asentamientos de aves marinas presentaron mayores abundancias del marcador de la fijación de nitrógeno, donde la mayor abundancia la presentaron las gaviotas (Ld) con $2,5 \times 10^{10}$ copias por gramo de suelo, pero sin diferencias significativas respecto al control ($1,1 \times 10^{10}$ copias por gramo de suelo).

En el caso de la nitrificación, determinada por la abundancia del marcador *amoA*, las abundancias entre los suelos se mantienen similares al control o mayores, pero sin existir diferencias significativas.

El potencial de desnitrificación fue determinado por 5 marcadores diferentes (*narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* y *nosZ*) los cuales, en general, fueron más abundantes en los suelos de asentamientos animales que en suelo control, aunque tampoco presentaron diferencias significativas con la única excepción del marcador *nosZ*. El marcador del último paso de la desnitrificación, (*nosZ*) mostró ser significativamente más abundante en suelos influenciados por elefantes marinos (MI) y pingüinos (Pa) por casi dos órdenes de magnitud.

En los suelos influenciados por animales, fueron casi siempre más abundantes los marcadores en relación con los suelos sin animales, donde generalmente los asentamientos de aves marinas aquellos que presentaron las mayores abundancias de estos genes.

Abundancias vs parámetros edáficos

En general, las abundancias de los genes estudiados en estos suelos muestran tendencias positivas a su relación con los diferentes parámetros edáficos, es decir, que sus abundancias aumentan cuando los niveles de estos parámetros en el suelo son mayores. La excepción de lo anterior es el marcador *nifH* que presenta relaciones inversas con los nutrientes del suelo donde sus abundancias se ven disminuidas con el aumento de algunos nutrientes del suelo. Sin embargo, ninguna de estas relaciones anteriores resultó ser significativa.

De los parámetros edáficos determinados, solo el amonio presenta una clara relación con las abundancias de los marcadores de genes nitrificantes y desnitrificantes (excepto *norB*). También tienen valores significativos, la relación lineal entre otros parámetros como el nitrato, fósforo y la conductividad eléctrica con la abundancia de genes de la desnitrificación (Tabla 5).

Las abundancias de los genes desnitrificantes (*narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* y *nosZ*) son los que se ven más afectados por los parámetros edáficos, principalmente los niveles de nitrógeno (amonio y nitrato), los niveles de fósforo y la conductividad eléctrica de los suelos. No ocurre así con *amoA* (nitrificación) que, a pesar de presentar valores positivos, no tiene buenas relaciones lineales con los parámetros edáficos medidos; o como *nifH* (fijación de N), el cual tiene principalmente relaciones lineales negativas con estos mismos parámetros, pero ninguna relación significativa.

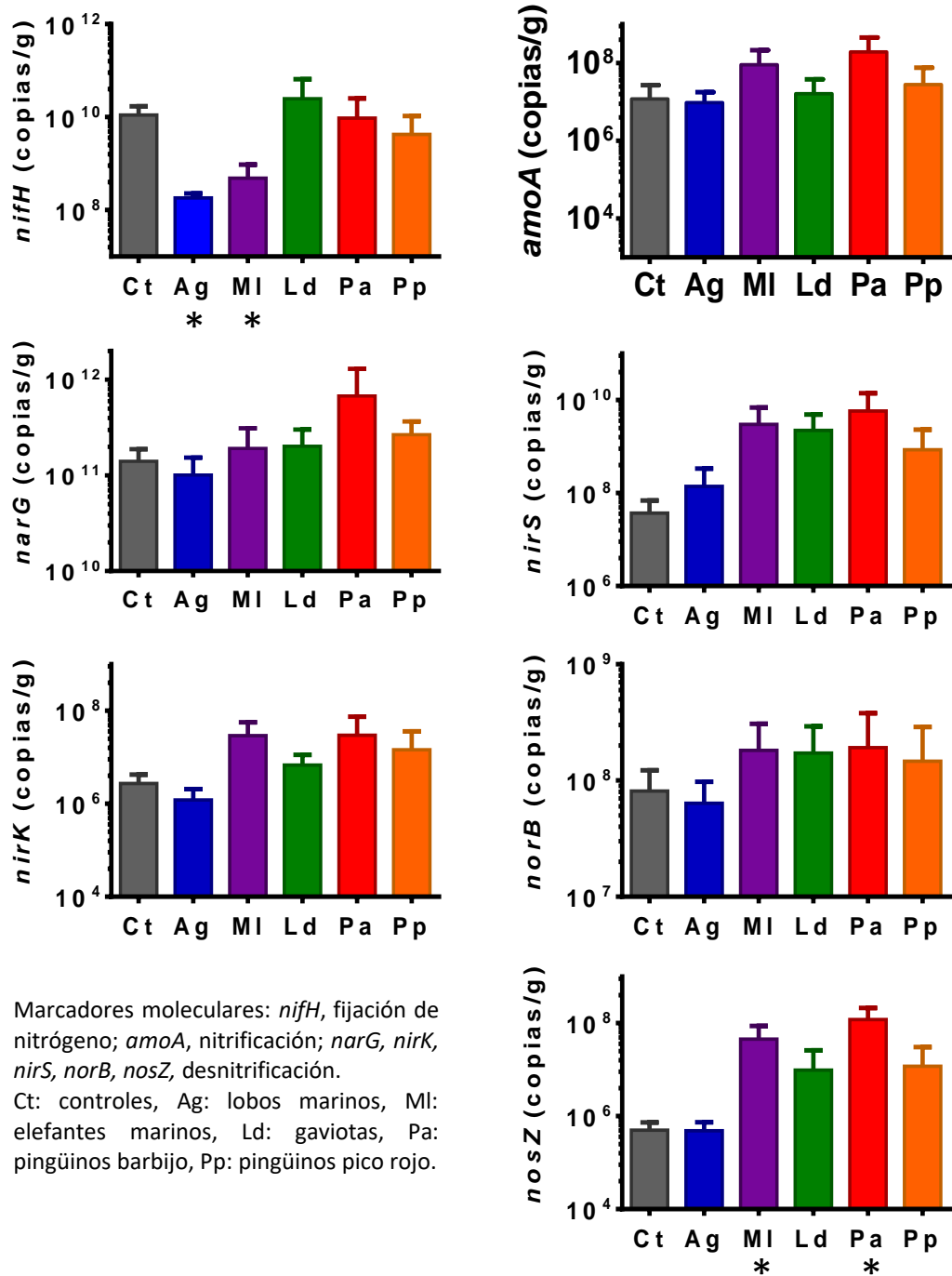


Figura 8. Abundancias de genes por tipo de suelo. Cuantificación mediante PCR en tiempo real de los genes *nifH*, *amoA*, *narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* y *nosZ*. Se muestran los valores promedio + error estándar basados en 3 réplicas biológicas. Los valores significativamente diferentes con respecto al Control se señalan con un asterisco (intervalos de confianza del 95% no superpuestos).

Tabla 5. Relación entre parámetros edáficos y abundancia de genes. Análisis de regresión lineal entre los parámetros edáficos y la abundancia de los genes involucrados en ciclo del nitrógeno.

R²

	<i>nifH</i>	<i>amoA</i>	<i>narG</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>norB</i>	<i>nosZ</i>
pH	0,4692	0,3418	0,1411	0,4230	0,5406	0,6127	0,3377
CH	0,2288	0,5221	0,6604	0,5325	0,4863	0,5655	0,5261
MO	-0,2015	0,2436	0,5111	0,1898	0,1404	0,1428	0,2654
N-NH₄⁺	-0,2568	0,9196	0,8288	0,9631	0,8619	0,7712	0,9026
N-NO₃⁻	-0,0417	0,6236	0,7117	0,0862	0,6466	0,7891	0,6290
P-Bray	-0,2412	0,6588	0,8003	0,6134	0,5595	0,4848	0,6681
CE	0,0846	0,6729	0,7579	0,7742	0,7579	0,8737	0,6856

valores p

	<i>nifH</i>	<i>amoA</i>	<i>narG</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>norB</i>	<i>nosZ</i>
pH	0,3566	0,4492	0,7127	0,3788	0,2457	0,2710	0,2952
CH	0,6565	0,2416	0,0700	0,2643	0,2984	0,3111	0,0939
MO	0,6954	0,5914	0,1701	0,6958	0,7676	0,8012	0,4140
N-NH₄⁺	0,6173	0,0297	0,0185	0,0335	0,0548	0,1609	0,0013
N-NO₃⁻	0,9355	0,1578	0,0465	0,1085	0,1608	0,1507	0,0407
P-Bray	0,6390	0,1341	0,0239	0,1954	0,2288	0,3873	0,0282
CE	0,8697	0,1253	0,0341	0,0964	0,1031	0,1088	0,0236

Se muestran el coeficiente de correlación lineal de Pearson *r* y el valor *p*; se destacan las relaciones significativas. CH: contenido hídrico, MO: materia orgánica, N-NH₄⁺: contenido de nitrógeno del amonio, N-NO₃⁻: contenido de nitrógeno del nitrato, P-Bray: contenido de fósforo, CE: conductividad eléctrica. *nifH*: marcador molecular de la fijación de nitrógeno; *amoA*: marcador molecular de la nitrificación; *narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* y *nosZ*: marcadores moleculares de la desnitrificación.

DISCUSIÓN

Las áreas libres de hielo en la Antártica están sujetas a bajas temperaturas, y sus suelos se caracterizan, generalmente, por sus bajos niveles de humedad, carbono y nitrógeno, así como su baja capacidad amortiguadora (Aislabe et al. 2006). Sin embargo, en las costas antárticas, los desechos animales corresponden a un factor determinante en la composición de nutrientes del suelo, enriqueciéndolos en nitrógeno y carbono total (Chong et al. 2009), además de otros elementos clave para sostener las comunidades bacterianas del suelo.

En los suelos de Cabo Shirreff, el pH no fue significativamente diferente entre el suelo de diferentes animales y el suelo control. En estudios previos, el pH se midió en diferentes capas de suelos ornitogénicos (es decir, formados por aves); la capa superficial es de pH neutro, mientras que las capas más profundas son ligeramente ácidas (Tatur & Myrcha 1984). Las muestras de esta Tesis corresponden a suelos superficiales, por lo que los valores obtenidos para este parámetro concuerdan con los estudios previos (Tatur & Myrcha 1984; Kim et al. 2012; Wang et al. 2015).

En esta Tesis también se encontraron niveles significativamente altos de nutrientes inorgánicos como amonio, nitrato y fósforo en suelos influenciados por animales comparados con el suelo control (sin influencia de animales), concordando con reportes previos de suelos en la península Fildes (Chong et al. 2009; Kim et al. 2012; Wang et al. 2015). Sin embargo, los lobos marinos antárticos (Ag) gaviotas (Ld) fueron aquellos que presentaron la menor influencia en los parámetros edáficos suelo al tener una composición más similar a los suelos control. Ésto podría deberse al comportamiento menos sedentario que tienen estos animales comparados con los

elefantes marinos (MI) o los pingüinos (Pa y Pp) (Staniland et al. 2004; Lisnizer et al. 2015), además de la densidad de las colonias, ya que por ejemplo al año 2009 existían cerca de 5000 parejas de pingüinos en el Cabo Shirreff (ASPA 149 2016). Las pingüineras presentaron los niveles más altos de los nutrientes medidos, siendo significativamente mayor el nitrógeno y fósforo en comparación con el suelo control que no tiene influencia de animales, coincidiendo con estudios anteriores los cuales indican que los suelos con asentamientos de pingüinos presentan elevados niveles de nutrientes como carbono, nitrógeno y fósforo (Chong et al. 2009; Zhu et al. 2009, 2013). Estos altos valores en los niveles de nutrientes encontrados en los suelos de asentamientos animales se deben a la transferencia de materia orgánica que realizan éstos sobre los suelos, principalmente por sus deposiciones y guano. Las deposiciones y el guano se caracterizan por su alto contenido de nutrientes como amoníaco, ácido úrico, fosfórico, oxálico y ácidos carbónicos, y sales, entre otros, que serán mineralizados enriqueciendo el suelo. Debido a esto, es esperable que los suelos ocupados por colonias de animales presenten mayores niveles de estos nutrientes en comparación al suelo mineral o sin influencia de animales. El guano de pingüino tiene gran cantidad de fosfatos (Tatur et al. 1990; Tschërko et al. 2003) en comparación a las deposiciones de otros animales marinos, siendo, por tanto, los suelos de pingüineras los que tienen mayor concentración de fósforo (Zhu et al. 2011). Los suelos influenciados por asentamientos animales (excepto por los de lobos marinos) presentaron niveles significativamente altos de CE. Este aumento de conductividad ($>1400 \mu\text{S}/\text{cm}$), respecto a los suelos control ($176 \mu\text{S}/\text{cm}$), puede explicarse por el enriquecimiento de electrolitos en el suelo debido a la actividad animal. Nuevamente, son los suelos influenciados por pingüinos los que presentaron

valores más altos de CE, alrededor de 10 veces mayores en comparación con el control. Este resultado coincide con lo encontrado por Aislabie et al. (2009), donde la CE en suelos previamente colonizados y actualmente ocupados por pingüinos presentan valores de conductividad por sobre los 700 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Hasta donde tenemos conocimiento, no existen estudios previos que describan las comunidades microbianas de los suelos antárticos del cabo Shirreff en la isla Livingston (parte de las islas Shetland del Sur). Sin embargo, en la península Fildes de la isla Rey Jorge, también ubicada en las Islas Shetland del Sur, varios estudios han descrito la influencia de los pingüinos y otras aves marinas (Tatur & Myrcha, 1984; Kim et al. 2012; Wang et al. 2015), así como los asentamientos de mamíferos (Wang et al. 2015) en esos suelos antárticos. Probablemente debido al mejor acceso, estas áreas han estado sujetas a constantes perturbaciones humanas (Braun et al. 2012). Es sabido que el impacto de las actividades humanas puede provocar alteraciones en el ambiente Antártico (Tin et al. 2009). Siendo una zona especialmente protegida (ASPA 149 2016), el Cabo Shirreff es un área con gran diversidad faunística y con mucho menor presencia humana, haciéndolo un excelente sitio de estudio para este trabajo.

En esta Tesis se propuso estudiar cómo los asentamientos animales influyen a los grupos funcionales relacionados con el ciclo del N en un lugar prístino con mínima influencia y presencia humana. Para esto, las técnicas independientes de cultivo han sido una gran contribución para el entendimiento de la diversidad y distribución de los microorganismos en el ambiente. Con ello, el desarrollo de marcadores moleculares ha permitido detectar estos organismos directamente desde su ambiente natural. En este caso, el uso de marcadores funcionales para los

distintos pasos del ciclo del nitrógeno. El enriquecimiento de los suelos antárticos por desechos animales propicia un aumento en la biomasa microbiana, actividad enzimática y respiración celular, entre otros procesos metabólicos (Zdanowski et al. 2005). Estudios como el de Aislabie et al. (2009) han encontrado que los cambios en los parámetros del suelo tienen influencia en la composición de las comunidades bacterianas del suelo, por lo que se esperaría también un cambio en la abundancia de los genes relacionados al ciclado del nitrógeno.

El gen *nifH* es el marcador más frecuentemente utilizado para el estudio de bacterias fijadoras de N, cuya abundancia se ha visto relacionada negativamente con el aumento del nitrógeno inorgánico (Lindsay et al. 2010) o con la actividad fijadora de nitrógeno en suelos. Pérez et al. (2017) determinaron que la fijación de nitrógeno se ve disminuida en suelos antárticos con colonias de pingüinos, los cuales aumentan los niveles de nitrógeno, por efecto de la adición de guano. En esta Tesis se observó que la abundancia de *nifH* estuvo levemente disminuida en los suelos ocupados por animales, comparado al control (sin influencia aparente de animales y/o plantas), aunque sin diferencias significativas. Esta disminución de la abundancia de *nifH* podría explicarse porque, a pesar de estar presente el marcador molecular de este grupo funcional (*nifH*), es la actividad enzimática la que se encuentra inhibida (Wertz 2009), por los altos niveles de nitrógeno presente en los suelos estudiados. Los resultados con *nifH* mostraron una leve tendencia negativa para las relaciones lineales de este gen versus parámetros como el amonio y nitrato, concordando con otros estudios similares donde no se ha encontrado una relación significativa entre el número de copias del gen *nifH* y los parámetros edáficos (Levy-Booth & Winder 2010, Yergeau et al. 2007). De acuerdo con Levy-Booth et al. (2014), aunque existen

relaciones de la abundancia de *nifH* con los niveles de carbono y/o nitrógeno total, éstas se dan en suelos de bosques, no así en suelos sin vegetación y de tundra como los suelos antárticos, en los que esta relación no ha sido estudiada previamente.

El 80% del nitrógeno presente en el guano está en forma de ácido úrico, el cual es mineralizado en amonio, donde continuará el ciclo hacia la nitrificación/desnitrificación (Lindeboom 1984). La nitrificación se estudia utilizando principalmente el gen marcador *amoA*, al ser una secuencia altamente conservada. El rol de la amonio monooxigenasa, codificada por el gen *amoA*, es esencial en el metabolismo del amonio y es el paso limitante del ciclo del nitrógeno (Caffrey et al. 2007). En esta Tesis se observaron niveles levemente mayores, aunque no significativos, en las abundancias determinadas de *amoA* para los suelos de animales, con respecto al control. Las regresiones lineales del marcador de la nitrificación con los parámetros edáficos fueron positivas en todos los casos, siendo significativa sólo la relación con el amonio. Esto es esperable pues las bacterias oxidadoras de amonio utilizan el amonio como fuente de energía, lo que les permite fijar carbono a partir de CO₂ como fuente de carbono (Andrade et al. 2015). En un estudio utilizando microcosmos de suelos antárticos con la adición de nitrógeno en forma de urea (simulando desechos animales), se observó un aumento, leve y solo significativo en algunos casos, de la abundancia de *amoA* y *narG* (desnitrificación) (Jung et al. 2011). Estas relaciones se explicarían debido a que al haber mayor contenido de NH₄⁺, habría una fuente de energía mayor para las bacterias oxidantes de amonio, por lo que existiría un mayor número de copias del gen *amoA*, indicador de la presencia de oxidadores de amonio (Wankel et al. 2011), cuya actividad tiene

como resultado aumentar los niveles de NO_3^- , que a su vez actúan como sustrato para el paso siguiente, la desnitrificación (Fowler et al. 2013).

La desnitrificación se puede estudiar a través de varios marcadores que corresponden a los distintos pasos del proceso. Específicamente, para la etapa de reducción de NO_3^- a NO_2^- se utiliza el gen *narG*, para la conversión de NO_2^- en NO los marcadores *nirK/nirS*, y finalmente, los marcadores *norB* y *nosZ* se utilizan para estudiar los últimos pasos del ciclo que corresponde a la reducción de NO a N_2O , el cual finalmente es reducido hasta N_2 . Aunque las abundancias de los genes de los desnitrificadores fueron mayores en los suelos de colonias animales (excepto para las gaviotas) comparadas con los suelos control, solo fue significativamente mayor la abundancia de *nosZ* en una de las pingüíneras (Pa). Un mayor contenido de nitrato como el encontrado en las pingüíneras estaría favoreciendo la desnitrificación que se espera esté asociada un aumento en las poblaciones de bacterias denitrificadoras. Este aumento se vería reflejado en una mayor abundancia de los genes de la desnitrificación, como *nosZ*. Estudios previos en estos suelos muestran que hay una alta cantidad de nitrógeno presente en diversas formas, como amonio y nitrato, lo que podría aumentar los niveles de emisión de N_2O , como se ha reportado para otras pingüíneras en suelos de Antártica marítima (Zhu et al. 2008; Pérez et al. 2017). Sin embargo, al haber una alta abundancia del gen *nosZ*, el cual codifica para la enzima óxido nitroso reductasa (N_2OR) que cataliza la reducción enzimática de N_2O a N_2 , los niveles de gases emitidos en estos ecosistemas podrían estar controlados, al menos en parte, por un grupo de microorganismos que actuarían como un sumidero de N_2O .

El aumento en el nivel de amonio se encuentra fuertemente relacionado con la abundancia de los genes desnitrificantes, siendo sólo significativas las relaciones con

los marcadores *nirK/nirS* y *nosZ*. Esto se explica porque el paso limitante del ciclo es la oxidación de amonio con la consecuente formación de nitrato, el cual pasará al proceso de desnitrificación. Al ser el amonio la principal fuente de nitratos, la desnitrificación y las bacterias desnitrificantes están limitadas a la producción de nitratos por las bacterias nitrificantes, relacionadas a la abundancia de *amoA*. El nitrato presenta relaciones significativas con las abundancias de los genes *narG* y *nosZ*. Esto se debe a que el nitrato es el primer sustrato para las bacterias desnitrificantes. Por esta razón, se espera que el gremio de desnitrificadores se vea aumentado al haber más sustrato.

Las concentraciones de fósforo y CE se relacionan positivamente con las abundancias de genes, y se encuentran fuertemente relacionadas a los marcadores *narG*, *nirK* y *nosZ*, que presentan las mejores regresiones lineales y significativas con estos nutrientes. Estos resultados sugieren que tanto el fósforo como la conductividad eléctrica tienen influencia en la abundancia de estos genes. El fósforo es un nutriente esencial, por lo que un aumento permite una mayor actividad de los microorganismos presentes en estos suelos, en este caso una mayor abundancia de microorganismos relacionados al ciclo del nitrógeno, siendo importante su relación con la abundancia de los genes desnitrificantes *narG* y *nosZ*.

La conductividad eléctrica es una medida del contenido de sales en el suelo y es un indicador de la disponibilidad de nutrientes. Los suelos antárticos que están sometidos a la adición constante de guano y deposiciones animales presentan gran mineralización de éstos. Por esto es esperable que la salinidad aumente como consecuencia de la mineralización y con ello aumente la CE, lo que resulta en una relación positiva con las abundancias de los siete genes presentados aquí. Debido a

que existe una relación directa significativa entre *narG* y *nosZ* con los nutrientes del suelo, existe también la misma relación con la CE.

Los resultados mencionados anteriormente soportan, por tanto, la hipótesis de que las modificaciones de los parámetros edáficos, principalmente el aumento de los nutrientes en los suelos, provocadas por los animales marinos antárticos efectivamente están influyendo en las abundancias de los marcadores de los grupos funcionales bacterianos relacionados con el ciclo del nitrógeno. En particular, aumentando las abundancias de los marcadores de nitrificación y desnitrificación, principalmente por el aumento en los niveles de nitrógeno en suelo en forma de amonio y nitrato.

CONCLUSIONES

En la Antártica marítima, específicamente en los suelos de asentamiento animales del Cabo Shirreff, se encuentran altos niveles de materia orgánica y nutrientes, como nitrato, amonio y fósforo, además de una alta conductividad, los que se relacionan positivamente con la abundancia de genes claves del ciclo del nitrógeno.

Los suelos influenciados por animales presentan niveles más altos de nutrientes en comparación al control. De los 5 suelos comparados, las pingüíneras tienen más diferencias de sus parámetros edáficos con respecto al suelo control. Éstas presentaron diferencias significativas con los niveles de amonio, nitrato y fósforo, además de la conductividad eléctrica. Los suelos de lobos y elefantes marinos y de gaviotas solo presentan diferencias importantes en la conductividad.

De los parámetros medidos, el amonio es el parámetro edáfico que más afecta la abundancia de más genes. Seis de los siete genes estudiados en esta tesis, se vieron afectados, positiva y significativamente por los niveles de amonio en el suelo. Otros parámetros que parecen influenciar las abundancias de genes desnitrificantes son el nitrato y el fósforo, como también la conductividad, que se relacionan más significativamente con los genes *narG* y *nosZ*, el primer y último paso de la desnitrificación.

REFERENCIAS

Aber, JD, Melillo, JM, Nadelhoffer, KJ, Pastor, J, Boone, RD (1991). Factors controlling nitrogen cycling and nitrogen saturation in northern temperate forest ecosystems. *Ecol. Appl.*, 1(3): 303-315.

Aber, JD, Nadelhoffer, KJ, Steudler, P, Melillo, JM (1989). Nitrogen saturation in northern forest ecosystems. *BioScience*, 39(6). 378-286.

Aislabie, JM, Chhour, KL, Saul, DJ, Miyauchi, S, Ayton, J, Paetzold, RF, Balks, MR (2006). Dominant bacteria in soils of Marble point and Wright valley, Victoria land, Antarctica. *Soil Biol Biochem.* 38(10): 3041-3056.

Andrade Ochoa, S, Erosa de la Vega, G, Nevárez Moorillón, GV (2015). Amonio-oxidadas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoamericana*, 33(3): 233-245.

ASP 149. Antarctic Specially Protected Area No. 149: Cape Shirreff and San Telmo Island, Livingston Island, South Shetland Islands: Revised Management Plan. XXXIX Antarctic Treaty Consultative Meeting; 2016.

Braker, G, Fesefeldt, A, Witzel, KP (1998). Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10): 3769-3775.

Braker, G, y Tiedje, JM (2003). Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(6): 3476-3483.

Braker, G, Zhou, J, Wu, L, Devol, AH, Tiedje, JM (2000). Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5):2096-2104.

Braun, C, Mustafa, O, Nordt, A, Pfeiffer, S, Peter, HU (2012). Environmental monitoring and management proposals for the Fildes region, King George Island, Antarctica. *Polar Res*, 31(1): 18206.

Bray, RH, y Kurtz, LT (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59(1): 39-46.

Bru, D, Sarr, A, Philippot, L (2007). Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(18): 5971-5974.

Caffrey, JM, Bano, N, Kalanetra, K, Hollibaugh, JT (2007). Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J*, 1(7): 660-662.

Canfield, DE, Glazer, AN, Falkowski, PG (2010). The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*, 330(6001): 192-196.

Chong, CW., Dunn, MJ, Convey, P, Tan, GA, Wong, RC, Tan, IK (2009). Environmental influences on bacterial diversity of soils on Signy Island, maritime Antarctic. *Polar Biol.* 32(11): 1571-1582.

Chong, CW, Pearce, DA, Convey, P, Tan, IKP (2012). The identification of environmental parameters which could influence soil bacterial community composition on the Antarctic Peninsula-a statistical approach. *Antarct. Sci.* 24(3): 249-258.

Cowan, DA, Makhalanyane, TP, Dennis, PG, Hopkins, DW (2014). Microbial ecology and biogeochemistry of continental Antarctic soils. *Front. Microbiol*, 5: 154.

Cowan, DA, Russell, NJ, Mamais, A, Sheppard, DM (2002). Antarctic Dry Valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass. *Extremophiles*, 6(5): 431-436.

Falkowski PG y Godfrey LV. (2008). Electrons, life and the evolution of Earth's oxygen cycle. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363(1504): 2705–2716

Farell, EM, y Alexandre, G (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Res. Notes.* 5(1): 257.

Fierer, N, y Jackson, RB (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(3): 626-631.

- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton Ma, Cape JN, et al. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 368(1621): 20130164
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, et al. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science.* 320(5878): 889–892
- Ganzert L, Lipski A, Hubberten HW, Wagner D (2011). The impact of different soil parameters on the community structure of dominant bacteria from nine different soils located on Livingston Island, South Shetland Archipelago, Antarctica. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76(3): 476-491
- Gilmour J (2011). Soil testing and nitrogen mineralization from soil organic matter. *Crop. Soils Mag.*, 44(02): 37-40
- Godfrey LV, y Falkowski PG. (2009). The cycling and redox state of nitrogen in the Archaean ocean. *Nat. Geosci.* 2(10): 725-729
- Hu HW, Chen D, He JZ (2015). Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: Understanding the biological pathways for prediction of emission rates. *FEMS Microbiol. Rev.* 39(5): 729-749
- Johnson C, Albrecht G, Ketterings Q, Beckman J, Stockin K. (2005). Nitrogen basics - The nitrogen cycle. Cornell University Cooperative extension: 1-2
- Jung J, Yeom J, Kim J, Han J, Lim HS, et al. (2011). Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. *Res. Microbiol.* 162(10):1018–1026
- Kim, OS, Chae, N, Lim, H, Cho, A, Kim, JH, Hong, SG, Oh, J, (2012). Bacterial diversity in ornithogenic soils compared to mineral soils on King George Island, Antarctica. *JMicrobiol* 50(6): 1081.
- Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. (2003). New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J. Dent. Res.* 82(5): 338-344

- Levy-Booth DJ, Prescott CE, Grayston SJ. (2014). Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 75:11–25
- Levy-Booth DJ, y Winder RS. (2010). Quantification of nitrogen reductase and nitrite reductase genes in soil of thinned and clear-cut Douglas-Fir stands by using real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(21):7116–7125
- Lindeboom, HJ (1984), The Nitrogen Pathway in a Penguin Rookery. *Ecology.* 65(1):269–277.
- Lindsay E, Colloff MJ, Gibb NL, Wakelin S. (2010). The abundance of microbial functional genes in grassy woodlands is influenced more by soil nutrient enrichment than by recent weed invasion or livestock exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(16):5547–5555
- Lisnizer, N, García-Borboroglu, P, Pascual, M, Yorio, P, (2015). Transfer processes drive population dynamics of kelp gull colonies in Patagonia: Implications for management strategies. *Mar. Biol. Res.* 11(7): 738–746.
- Lovett GM, Goodale CL. (2011). A new conceptual model of nitrogen saturation based on experimental nitrogen addition to an oak forest. *Ecosystems.* 14(4):615–631
- Meyer O. (1994). Functional groups of microorganisms. En E-D Schulze, H Mooney. (Eds). *Biodiversity and Ecosystem Function*, Springer Berlin Heidelberg. 99:67–96
- Murphy J y Riley JP. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* 27(27):31–36
- Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol.* 10(11):2966–2978
- Pérez CA, Aravena JC, Ivanovich C, McCulloch R. (2017). Effects of penguin guano and moisture on nitrogen biological fixation in maritime Antarctic soils. *Polar Biol.* 40:437–448

- Prieme A, Braker G, Tiedje JM. (2002). Diversity of nitrite reductase (nirK and nirS) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4):1893–1900
- Prosser JI. (1990) Autotrophic nitrification in bacteria. En A.H. Rose, D.W. Tempest (Eds.). *Adv. Microb. Physiol.* 30:125–181
- Ramirez KS, Craine JM, Fierer N. (2012). Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Glob. Chang. Biol.* 18(6):1918–27
- Rösch C, Bothe H. (2005). Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4):2026-2035.
- Roser, DJ, et al (1993). Microbiology of ornithogenic soils from the Windmill Islands, Budd Coast, continental Antarctica: microbial biomass distribution. *Soil Biol.Biochem.* 25(2):165-175.
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12):4704–4712.
- Sadzawka A, Carrasco MA., Grez R, Mora ML, Flores H, Neaman A. (2006). Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile, Revisión 2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas UNIA N°34, Santiago, Chile, p164.
- Schneider C, Rasband WS, Eliceiri KW. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* 9(7):671–75
- Simas FNB, Schaefer CEGR, Melo VF, Albuquerque-Filho MR, Michel RFM, et al. (2007). Ornithogenic cryosols from Maritime Antarctica: Phosphatization as a soil forming process. *Geoderma.* 138(3–4):191–203
- Staniland, IJ, Reid, K, Boyd, IL. (2004). Comparing individual and spatial influences on foraging behaviour in Antarctic fur seals *Arctocephalus gazella*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 275:263–274.

Steubing L, Godoy R, Alberdi M. (2002). Métodos en Ecología Vegetal. 1° Edición ed. Santiago de Chile: Editorial Universitaria.

Stevenson, F.J. (1982). Origin and distribution of nitrogen in soil. En: Stevenson, F.J. (Ed.) *Nitrogen in Agricultural Soils*. Agronomy Monograph. American Society of Agronomy, Madison, Wis. 22:1-42.

Tatur, A, Myrcha, A. (1984). Ornithogenic soils on King George Island, South Shetland Islands (Maritime Antarctic Zone). *Pol. Polar Res.* 5(12): 31–60.

Tatur A, Keck A. Phosphates in ornithogenic soils of the maritime Antarctic. Proceedings of the NIPR Symposium. *Polar Biol.* 1990; 3: 133–150. Throbäck IN, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49(3).401-417.

Tin T, Fleming ZL, Hughes KA, Ainley DG, Convey P, Moreno CA, et al. (2009) Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarct. Sci.* 21(1): 3–33.

Tscherko D, Bölter M, Beyer L, Chen J, Elster J, Kandeler E, et al. Biomass and enzyme activity of two soil transects at King George Island, Maritime Antarctica. *Arct Antarct Alp Res.* 2003; 35(1): 34–47.

Ugolini FC, Bockheim JG. (2008). Antarctic soils and soil formation in a changing environment: A review. *Geoderma.* 144(1–2):1–8

Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, et al. (1997). Technical report: Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Source Ecol. Appl.* 7(3):737–750

Vitousek PM, Hooper DU. (1994). Biological diversity and terrestrial ecosystem biogeochemistry. En: E-D Schulze, H Mooney (Eds). *Biodiversity and Ecosystem Function* SE. Springer Berlin Heidelberg. 99:3–14

Wang, NF, Zhang, T, Zhang, F, Wang, ET, He, JF, Ding, H, Zhang, BT, Liu, J, Ran, XB, Zang, JY. (2015). Diversity and structure of soil bacterial communities in the

Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing. *Front. Microbiol.* 6: 1–11.

Wankel SD, Mosier AC, Hansel CM, Paytan A, Francis CA. (2011). Spatial variability in nitrification rates and ammonia-oxidizing microbial communities in the agriculturally impacted Elkhorn Slough estuary, California. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(1):269–280

Wright P. (1995). Review nitrogen excretion: Three end products, many physiological roles. *J. Exp. Biol.* 281(2):273–281

Yang JE, Kim JJ, Skogley EO, Schaff BE. (1998). A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62(4):1108

Yergeau E, Kang S, He Z, Zhou J, Kowalchuk G. (2007). Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across an Antarctic latitudinal transect. *ISME J.* 1(2):163–179

Young JPW. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In G Stacey, RH. Burris, HJ Evans (Eds). *Biological Nitrogen Fixation*. 23: 43–86

Zdanowski MK, Zmuda MJ, Zwolska I. (2005). Bacterial role in the decomposition of marine-derived material (penguin guano) in the terrestrial maritime Antarctic. *Soil Biol. Biochem.* 37(3): 581–595.

Zhu R, Liu Y, Li X, Sun J, Xu H, Sun L. (2008). Stable isotope natural abundance of nitrous oxide emitted from Antarctic tundra soils: effects of sea animal excrements depositions. *Rapid Commun. Mass Sp.* 22(22):3570–3578

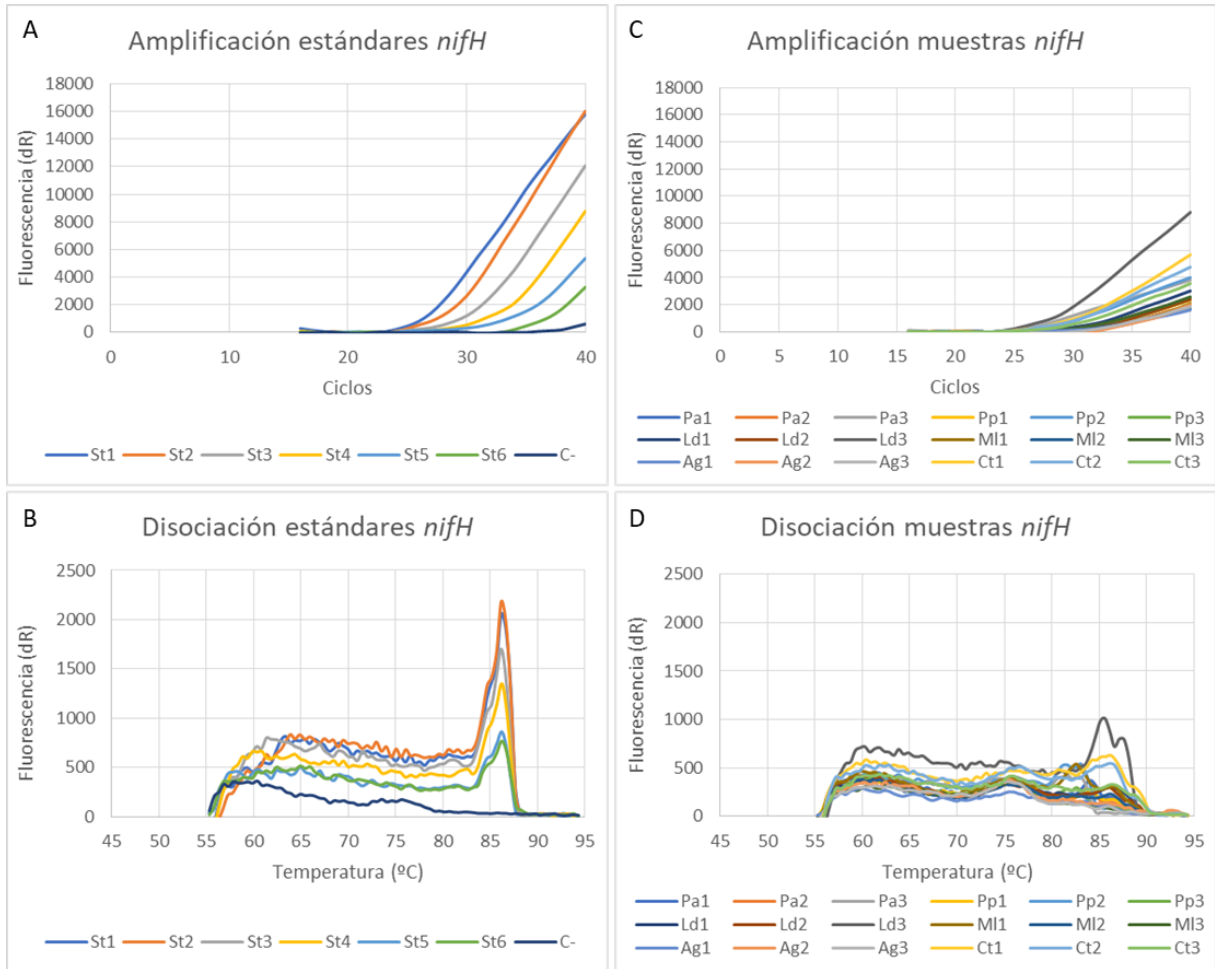
Zhu R, Liu Y, Ma E, Sun J, Xu H, Sun L. (2009). Greenhouse gas emissions from penguin guanos and ornithogenic soils in coastal Antarctica: Effects of freezing-thawing cycles. *Atmos. Environ.* 43(14):2336–2347

Zhu R, Liu Y, Xu H, Ma D, Jiang S. (2013). Marine animals significantly increase tundra N₂O and CH₄ emissions in Maritime Antarctica. *J. Geophys. Res-Biogeophys.* 118(4):1773–1792

Zhu R, Ma D, Ding W, Bai B, Liu Y, Sun J. Occurrence of matrix-bound phosphine in polar ornithogenic tundra ecosystems: effects of alkaline phosphatase activity and environmental variables. *Sci Total Environ.* 2011; 409(19): 3789–3800.

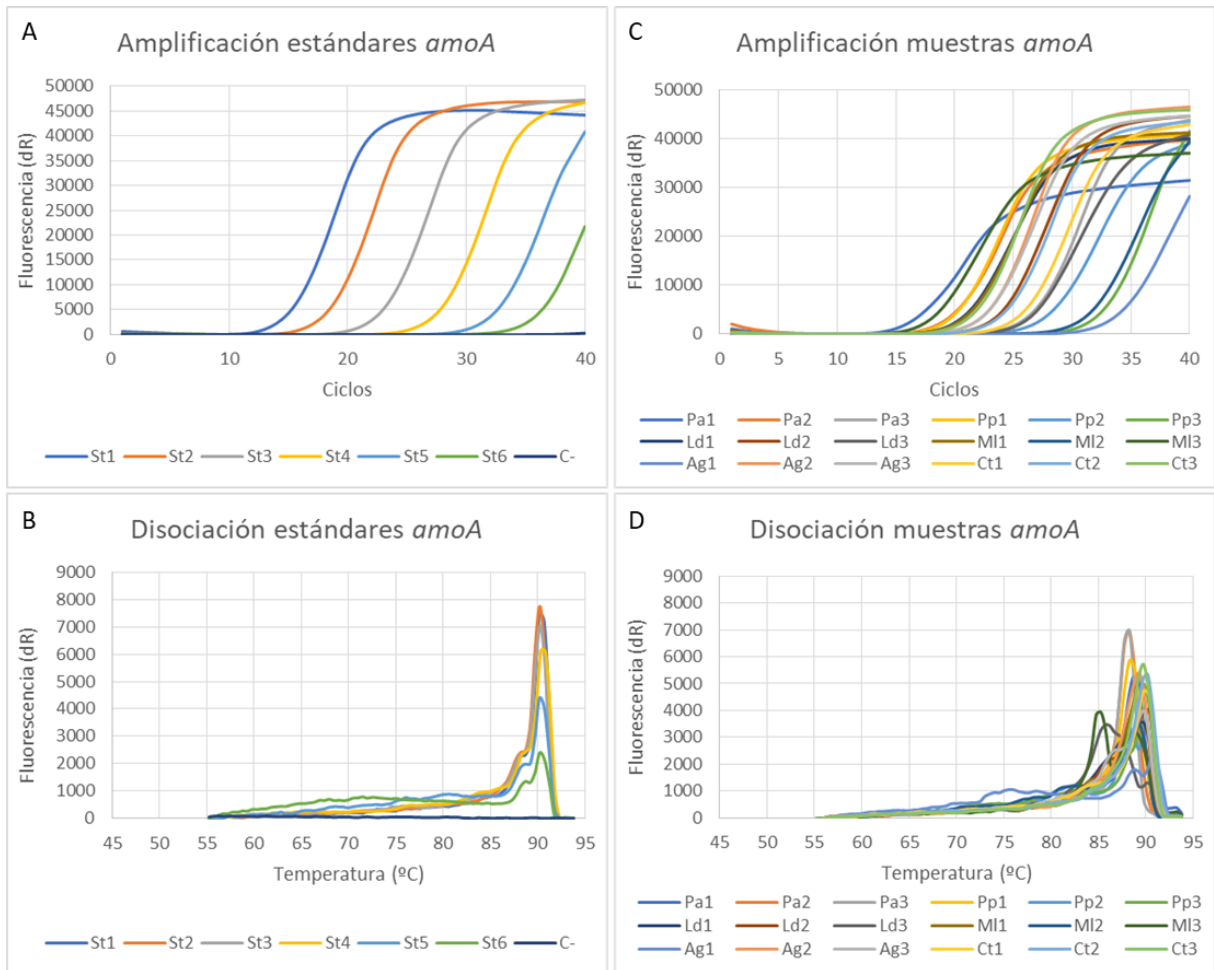
Zumft WG. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 61(4):533–616

ANEXO



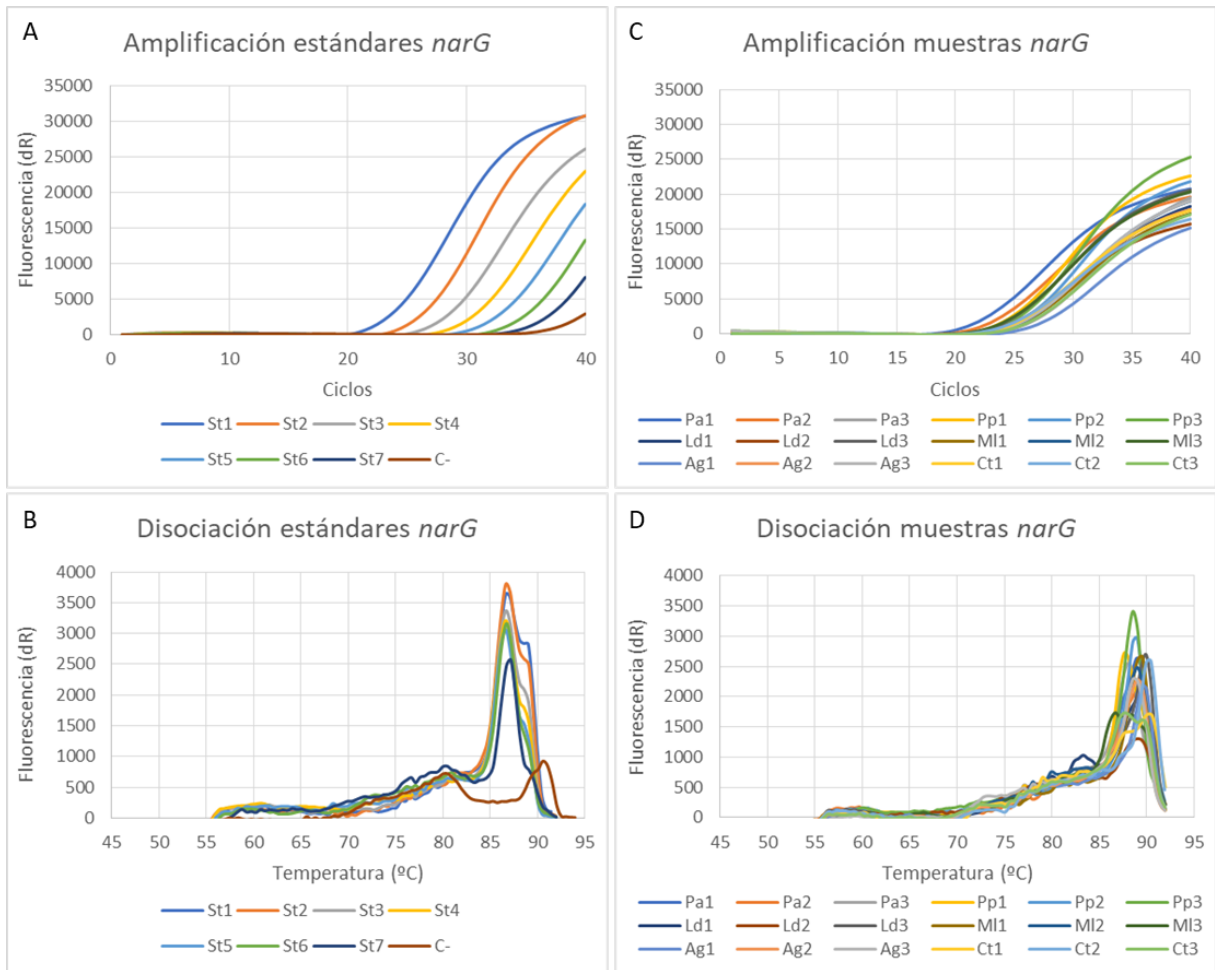
Anexo 1 Amplificación por PCR en tiempo real del gen *nifH*.

(A) Curva de amplificación de los estándares. (B) Curva de disociación de los estándares. (C) Curva de amplificación de las muestras. (D) Curva de disociación de las muestras. St1-St6: diluciones seriadas (1:4) del DNA del vector con el gen *nifH* como inserto. Ct: controles, Ag: *A. gazella*, MI: *M. leonina*, Ld: *L. dominicanus*, Pa: *P. antarctica*, Pp: *P. papua*.



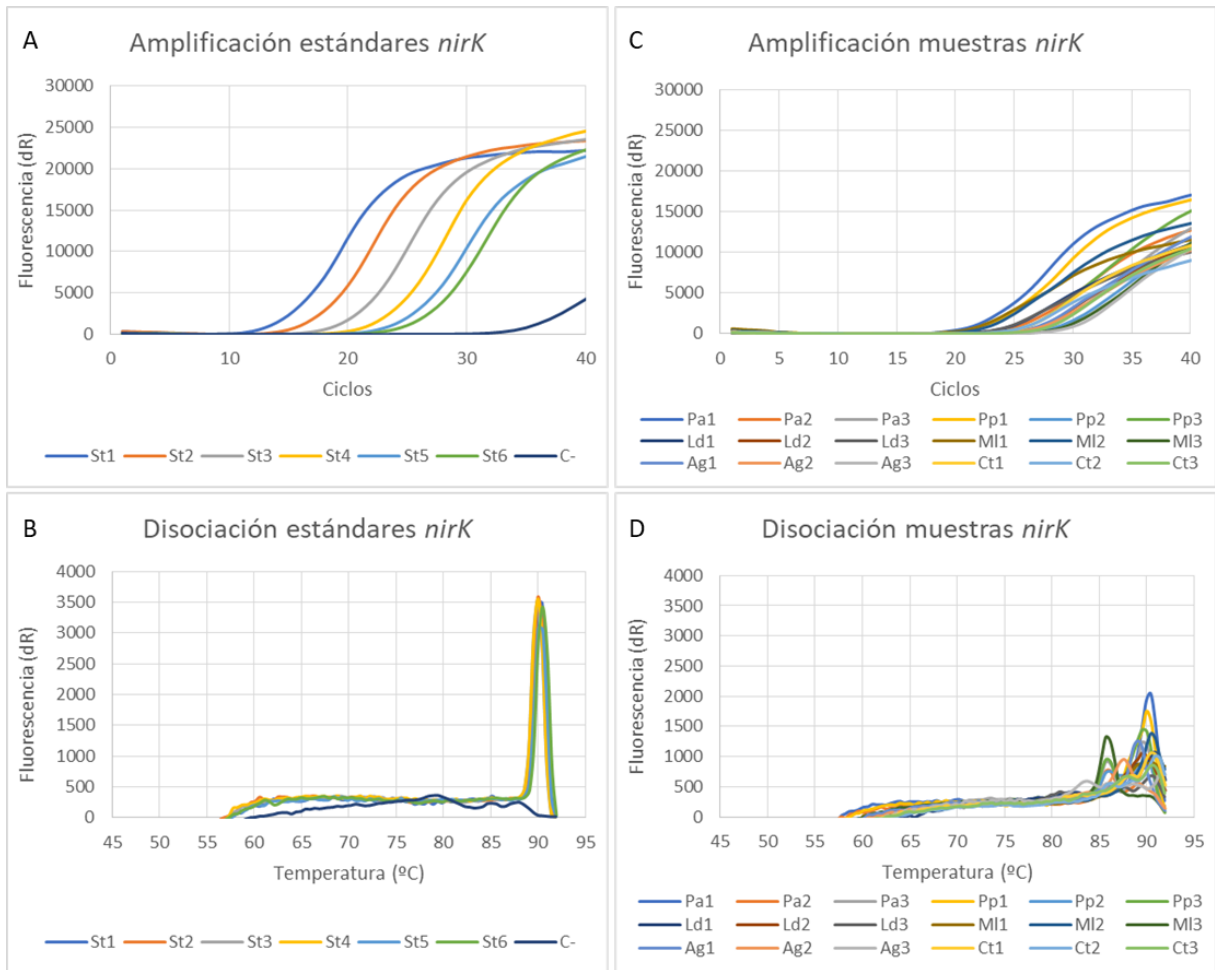
Anexo 2 Amplificación por PCR en tiempo real del gen *amoA*.

(A) Curva de amplificación de los estándares. (B) Curva de disociación de los estándares. (C) Curva de amplificación de las muestras. (D) Curva de disociación de las muestras. St1-St6: diluciones seriadas (1:20) del DNA del vector con el gen *amoA* como inserto. Ct: controles, Ag: *A. gazella*, MI: *M. leonina*, Ld: *L. dominicanus*, Pa: *P. antarctica*, Pp: *P. papua*.



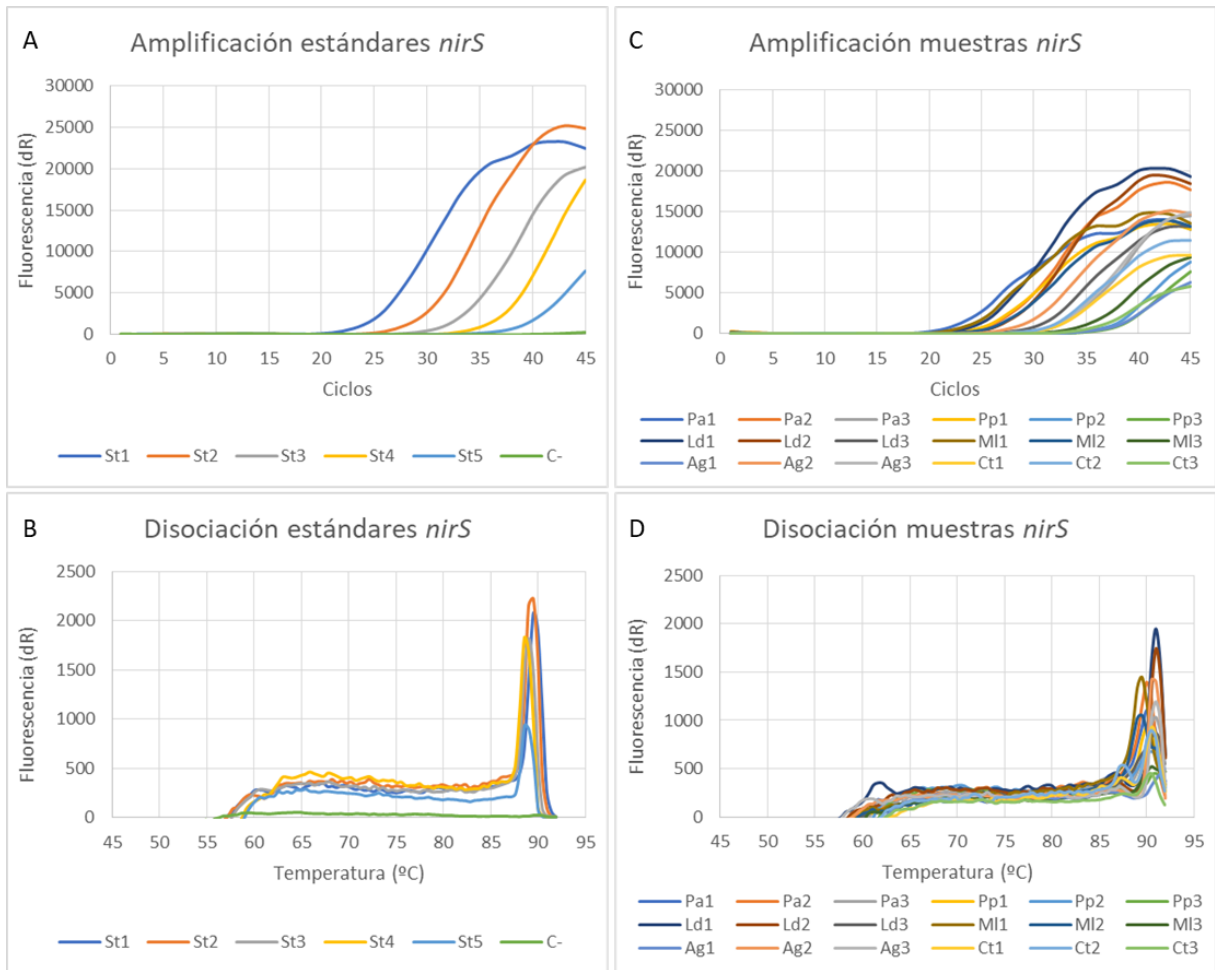
Anexo 3 Amplificación por PCR en tiempo real del gen *narG*.

(A) Curva de amplificación de los estándares. (B) Curva de disociación de los estándares. (C) Curva de amplificación de las muestras. (D) Curva de disociación de las muestras. St1-St7: diluciones seriadas (1:4) del DNA del vector con el gen *narG* como inserto. Ct: controles, Ag: *A. gazella*, Ml: *M. leonina*, Ld: *L. dominicanus*, Pa: *P. antarctica*, Pp: *P. papua*.



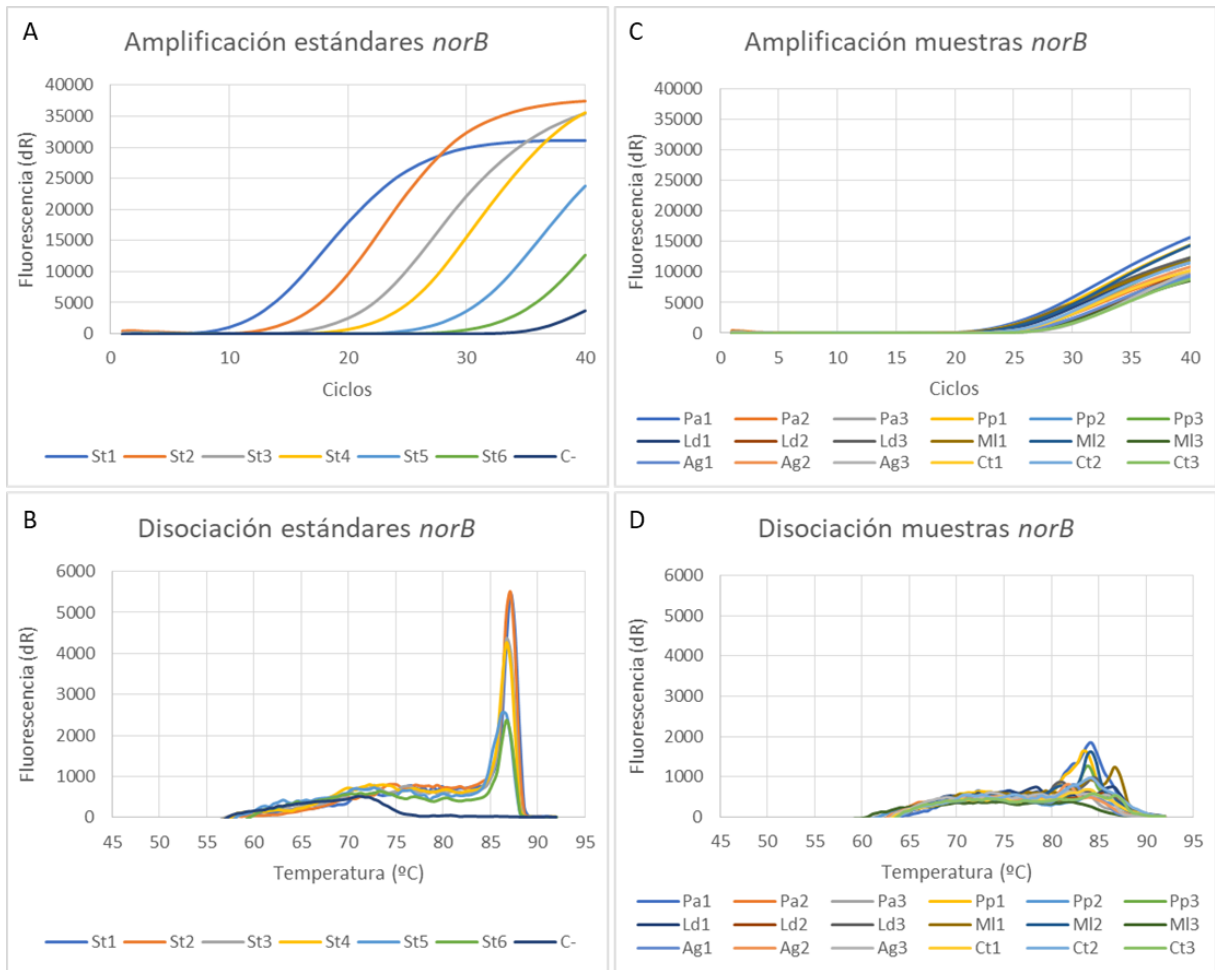
Anexo 4 Amplificación por PCR en tiempo real del gen *nirK*.

(A) Curva de amplificación de los estándares. (B) Curva de disociación de los estándares. (C) Curva de amplificación de las muestras. (D) Curva de disociación de las muestras. St1-St6: diluciones seriadas (1:5) del DNA del vector con el gen *nirK* como inserto. Ct: controles, Ag: *A. gazella*, MI: *M. leonina*, Ld: *L. dominicanus*, Pa: *P. antarctica*, Pp: *P. papua*.



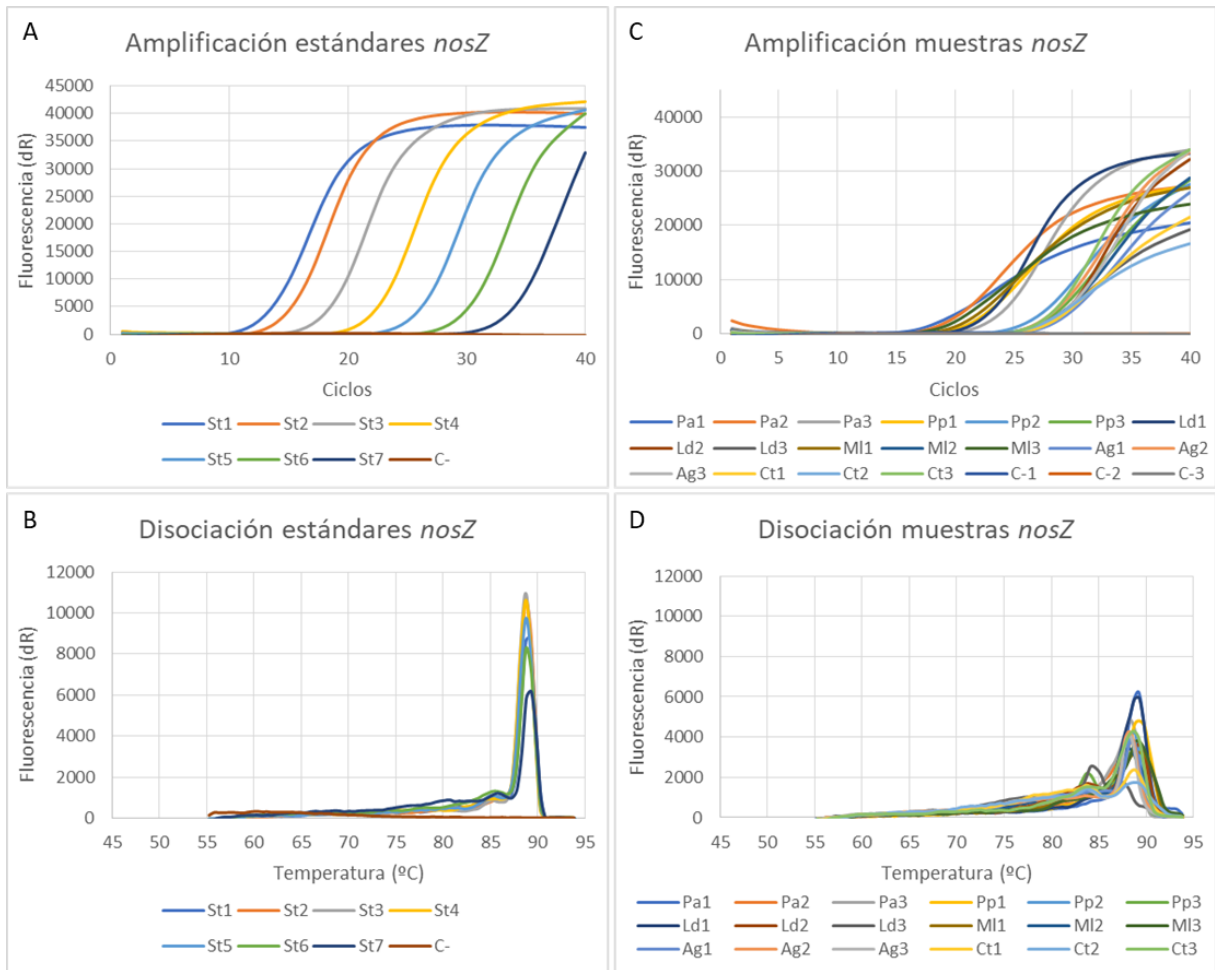
Anexo 5 Amplificación por PCR en tiempo real del gen *nirS*.

(A) Curva de amplificación de los estándares. (B) Curva de disociación de los estándares. (C) Curva de amplificación de las muestras. (D) Curva de disociación de las muestras. St1-St5: diluciones seriadas (1:10) del DNA del vector con el gen *nirS* como inserto. Ct: controles, Ag: *A. gazella*, Ml: *M. leonina*, Ld: *L. dominicanus*, Pa: *P. antarctica*, Pp: *P. papua*.



Anexo 6 Amplificación por PCR en tiempo real del gen *norB*.

(A) Curva de amplificación de los estándares. (B) Curva de disociación de los estándares. (C) Curva de amplificación de las muestras. (D) Curva de disociación de las muestras. St1-St6: diluciones seriadas (1:8) del DNA del vector con el gen *norB* como inserto. Ct: controles, Ag: *A. gazella*, MI: *M. leonina*, Ld: *L. dominicanus*, Pa: *P. antarctica*, Pp: *P. papua*.



Anexo 7 Amplificación por PCR en tiempo real del gen *nosZ*.

(A) Curva de amplificación de los estándares. (B) Curva de disociación de los estándares. (C) Curva de amplificación de las muestras. (D) Curva de disociación de las muestras. St1-St7: diluciones seriadas (1:10) del DNA del vector con el gen *nosZ* como inserto. Ct: controles, Ag: *A. gazella*, MI: *M. leonina*, Ld: *L. dominicanus*, Pa: *P. antarctica*, Pp: *P. papua*.

Anexo 8 Parámetros edáficos medidos en cada una de las muestras de suelo (promedio ± error estándar).

		Ct		Ag		MI		Ld		Pa		Pp	
Factor edáfico	pH	6,1	[0,1]	5,4	[0,2]	6,5	[0,4]	6,8	[0,5]	6,3	[0,7]	5,2	[0,2]
	^a CH	17,4	[2,8]	6,9	[3,9]	11,4	[4,1]	14,2	[3,0]	20,5	[5,0]	19,2	[2,6]
^b (μg/g)	^a MO	6,6	[3,9]	9,2	[2,6]	5,1	[1,2]	6,7	[2,1]	13,8	[1,9]	18,1	[6,5]
	^b N-NH ₄ ⁺	6,9	[3,4]	24,8	[13,4]	515,2	[232,7]	81,6	[54,5]	752,9	[200,9]	371,8	[61,1]
	^b N-NO ₃ ⁻	49,6	[5,3]	59,0	[37,1]	300,2	[142,6]	233,4	[83,7]	465,3	[96,6]	483,7	[72,2]
μS/cm	^b P-Bray	16,4	[7,3]	112,6	[61,2]	135,3	[28,2]	49,9	[21,1]	608,6	[54,8]	547,8	[23,8]
	CE (1:5)	176,0	[6,5]	245,7	[0,9]	1515	[8,8]	1419	[23,8]	2400	[100,2]	2143	[3,3]

Se muestran los valores y [error estándar]. Los valores en negrita son diferentes significativamente del control (Ct) de acuerdo al ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey. CH: contenido hídrico, MO: materia orgánica, N-NH₄⁺: contenido de nitrógeno del amonio, N-NO₃⁻: contenido de nitrógeno del nitrato, P-Bray: contenido de fósforo, CE: conductividad eléctrica. Ct: control, Ag: lobo marino, MI: elefante marino, Ld: gaviota, Pa: pingüino barbijo, Pp: pingüino pico rojo.

Anexo 9 Abundancias de genes por tipo de suelo. Cuantificación mediante PCR en tiempo real de los genes *nifH*, *amoA*, *narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* y *nosZ* en las muestras de suelos (promedio ± error estándar).

	Ct		Ag		MI		Ld		Pa		Pp	
<i>nifH</i>	1,1e ¹⁰	[2,8e ⁹]	1,8e ⁸	[2,1e ⁷]	4,9e ⁸	[2,2e ⁸]	2,5e ¹⁰	[1,9e ¹⁰]	9,5e ⁹	[7,5e ⁹]	4,2e ⁹	[3,0e ⁹]
<i>amoA</i>	1,2e ⁷	[7,0e ⁶]	9,6e ⁶	[3,9e ⁶]	9,0e ⁷	[5,9e ⁷]	1,6e ⁷	[1,0e ⁷]	1,92e ⁸	[1,2e ⁸]	2,8e ⁷	[2,3e ⁷]
<i>narG</i>	1,4e ¹¹	[2,3e ¹⁰]	1,0e ¹¹	[2,5e ¹⁰]	1,9e ¹¹	[5,6e ¹⁰]	2,0e ¹¹	[4,7e ¹⁰]	6,8e ¹¹	[2,9e ¹¹]	2,7e ¹¹	[4,7e ¹⁰]
<i>nirK</i>	2,7e ⁶	[8,8e ⁵]	1,2e ⁶	[4,9e ⁵]	2,9e ⁷	[1,6e ⁷]	6,8e ⁶	[2,6e ⁶]	2,9e ⁷	[2,6e ⁷]	1,4e ⁷	[1,2e ⁷]
<i>nirS</i>	3,7e ⁷	[1,8e ⁷]	1,4e ⁸	[1,1e ⁸]	3,0e ⁹	[2,3e ⁹]	2,2e ⁹	[1,5e ⁹]	5,8e ⁹	[4,7e ⁹]	8,5e ⁸	[8,5e ⁸]
<i>norB</i>	8,1e ⁷	[1,9e ⁷]	6,4e ⁷	[1,6e ⁷]	1,8e ⁸	[5,9e ⁷]	1,7e ⁸	[5,7e ⁷]	1,9e ⁸	[8,9e ⁷]	1,5e ⁸	[6,7e ⁷]
<i>nosZ</i>	5,5e ⁵	[1,1e ⁵]	4,9e ⁵	[1,2e ⁵]	4,5e ⁷	[2,0e ⁷]	9,7e ⁶	[7,6e ⁶]	1,2e⁸	[4,3e⁷]	1,2e ⁷	[8,8e ⁶]

Se muestran los valores promedio y [error estándar] basados en 3 réplicas biológicas. Los valores en negrita en una fila son significativamente diferentes del control (Ct) de acuerdo al ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey. *nifH*: marcador molecular de la fijación de nitrógeno; *amoA*: marcador molecular de la nitrificación; *narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* y *nosZ*: marcadores moleculares de la desnitrificación. Ct: controles, Ag: lobos marinos, MI: elefantes marinos, Ld: gaviotas, Pa: pingüinos barbijo, Pp: pingüinos pico rojo.