

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Influencia de los pingüinos barbijo (*Pygoscelis antarctica*)
sobre la comunidad procarionte y el gremio de
microorganismos diazotróficos en suelos de Isla Decepción,
Antártica***

**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:**

DIEGO NICOLÁS SEGURA CÁCERES

**Directora de Tesis: Dra. Beatriz Díez Moreno
Co-Directores de Tesis: Dra. Angélica Casanova Katny
Dr. Davor Cotoras Tadic**

Santiago-CHILE

Octubre 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

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 presentado por el candidato

DIEGO NICOLÁS SEGURA CÁCERES

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

Director de Tesis:

Dra. Beatriz Díez

Co-directores de Tesis:

Dra. Angélica Casanova

Dr. Davor Cotoras

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez

Dra. Julieta Orlando

Dra. Tatiana Garrido

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental de Sistemas Extremos, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Díez Moreno, Dra. Angélica Casanova-Katny y del Dr. Davor Cotoras Tadic.

La tesis contó con el financiamiento de los proyectos: Proyecto FONDECYT n° 1181745, Proyecto FONDECYT n° 1190998, INACH RT_04_19 y Proyecto FONDAP CR2 15110009.

Presentaciones a congresos

Segura, D., Cifuentes, J., Castillo, W., Casanova-Katny, A., Díez, B. 2019. Efecto de los pingüinos barbijos (*Pygoscelis antarctica*) sobre la comunidad diazotrófica en Isla Decepción, Antártica. XXXVI Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica. 29 Julio- 01 Agosto. Temuco, Chile.

Segura, D., Cifuentes, J., Castillo, W., Casanova-Katny, A., Díez, B. 2019. The effect of the chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*) colony on the diazotrophic bacterial community in Deception Island, Antarctica. 1st ISME Latin America Congress "Diversity at its best". 11-13 Septiembre. Valparaíso, Chile.

Segura, D., Casanova-Katny, A., Cifuentes, J., Díez, B. 2019. Influencia del guano de las pingüíneras sobre la comunidad diazotrófica en Isla Decepción, Antártica Marítima. IX Congreso Chileno de Investigaciones Antárticas. 3-5 Octubre. Olmúe, Chile.

Índice

Presentaciones a congresos.....	ii
Índice.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras suplementarias.....	vi
Índice de tablas suplementarias.....	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
Summary.....	x
1. Introducción.....	1
1.1.- Isla Decepción y el efecto del calentamiento global en Antártica.....	1
1.2.-Importancia de los pingüinos en la formación de suelos en Antártica.....	2
1.3.-Rol ecológico de los pingüinos en Antártica.....	5
1.4.-Comunidades microbianas en suelos de Isla Decepción.....	7
1.5.-Fijación de nitrógeno y microorganismos diazotróficos en Antártica.....	8
1.6.-Propuesta de investigación.....	13
2. Hipótesis de trabajo.....	15
3. Objetivos.....	16
3.1.-Objetivo General.....	16

3.2.- Objetivos Específicos.....	16
4. Metodología.....	17
4.1.-Sitio de muestreo	17
4.2.-Extracción de DNA genómico.....	22
4.3.-Identificación de la presencia del gen 16S rRNA y <i>nifH</i> mediante PCR de muestras de suelos antárticos.....	22
4.4.-Clonamiento del gen <i>nifH</i>	25
4.5.-Secuenciación masiva de los genes 16S rRNA y <i>nifH</i>	25
4.6.-Asignación taxonómica de las secuencias de 16S rRNA y análisis de diversidad y composición.....	26
4.7.-Identificación de secuencias <i>nifH</i>	28
4.8.-Predicción bioinformática de la ocurrencia de genes del metabolismo del nitrógeno.....	30
4.9.-Ensayos de reducción de acetileno (ARA).....	30
4.10.-Determinación de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo antártico.....	32
4.11.- Evaluación del efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la comunidad procarionte.....	34
5. Resultados.....	36
5.1.- Obtención del DNA y parámetros de calidad del material genético proveniente de muestras de suelo de Isla Decepción, Antártica.....	36
5.2.- Identificación del gen 16S rRNA en muestras de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica.....	38

5.3.- Identificación taxonómica de secuencias del gen 16S rRNA obtenidos mediante secuenciación masiva y determinación de métricas de alfa diversidad.....	38
5.4.- Diversidad y composición de la comunidad procarionte en base a la distancia de la pingüinera.....	42
5.5.- Ocurrencia de los miembros de la comunidad procarionte en las muestras de suelo antártico.....	44
5.6.- Análisis de beta-diversidad sobre la comunidad procarionte en suelos antárticos.....	51
5.7.- Presencia de microorganismos del gremio diazotróficos a través de la identificación del gen <i>nifH</i> mediante PCR en muestras de DNA extraídas de suelo de Isla Decepción, Antártica	53
5.8.- Identificación de secuencias del gen <i>nifH</i> de muestras de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica.....	55
5.9.-Identificación de genes relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno mediante aproximación bioinformática a partir de secuencias del gen 16S rRNA.....	60
5.10.- Efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la comunidad procarionte en muestras de suelo antártico.....	63
6. Discusión.....	70
6.1.- Efecto de la pingüinera sobre la geoquímica del suelo.....	70
6.2.- Efecto de la pingüinera sobre la microbiota.....	71
6.3.- Efecto de la pingüinera sobre la comunidad de microorganismos diazotróficos.....	74

6.4.- Dinámica del nitrógeno y rol ecológico de los pingüinos	79
7. Conclusiones.....	82
8. Referencias.....	83
9. Figuras suplementarias.....	96
10. Tablas suplementarias.....	106

Índice figuras

Figura 1.- Mapa de Isla Decepción, Islas Shetland del Sur, Península Antártica.....	18
Figura 2.- Puntos de muestreo a lo largo del transecto de estudio en Isla Decepción, Antártica.....	19
Figura 3.- Distribución de los sitios de muestreo en Isla Decepción, Antártica.....	20
Figura 4.- Gel agarosa 1% corrido con productos de amplificación del gen 16S rRNA en muestras de DNA extraído desde suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica.....	40
Figura 5: Índices de alfa-diversidad.....	41
Figura 6.- Abundancia relativa de las 20 phyla más abundantes en las muestras de suelo antártico.....	43
Figura 7.- Ocurrencia de los miembros de la comunidad procarionte a nivel de las 20 familias más abundantes en muestras de suelo antártico.....	46
Figura 8.- Diagrama de Venn que refleja los miembros de la comunidad procarionte compartidos a nivel de género considerando la distancia con respecto a la pingüinera.....	47
Figura 9.- Diagrama de Venn que refleja los miembros de la comunidad procarionte compartidos a nivel de género por sitio.....	49
Figura 10.- Análisis de distancia basado en UniFrac ponderado entre las comunidades procariontes.....	52

Figura 11.- Identificación de la presencia del gen <i>nifH</i> en muestras de suelo antártico.....	54
Figura 12.- Reconstrucción y posicionamiento filogenético de las secuencias <i>nifH</i> obtenidas con los partidores Ueda19F-R6 y PolF-PolR (Figura página previa).....	57
Figura 13.- Abundancia relativa de los ASVs obtenidos con los partidores PolF-PolR y Ueda19F-R6 en la muestra PUNTA-PA.....	59
Figura 14.- Abundancia de genes relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno a través de predicciones metagenómicas por medio de PICRUSt2	61
Figura 15.- Parámetros fisicoquímicos normalizados para las muestras de suelo antártico.....	67
Figura 16.- Análisis de correspondencia canónica (CCA) de la comunidad procarionte con las variables mediambientales.....	68
Figura 17.- Análisis de redes basados en correlación de Spearman sobre ASVs con abundancia relativa sobre el 0,5% y variables medioambientales.....	69

Índice de tablas

Tabla 1.- Localización de los sitios de muestreo en Isla Decepción, Antártica durante la Expedición Científica Antártica ECA55.....	21
Tabla 2.- Partidores utilizados para identificar la presencia del gen 16S rRNA y <i>nifH</i> en muestras de DNA de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica.....	23
Tabla 3.- Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de PCR según pareja de partidores usados para identificar la presencia del gen 16S rRNA y <i>nifH</i> en muestras de DNA de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica.....	23
Tabla 4.- Programas de PCR para la amplificación de genes 16S rRNA y <i>nifH</i> según pareja de partidores en muestras de suelo de Isla Decepción, Antártica.....	24
Tabla 5.- Códigos KOs de los genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno para el análisis de muestras de suelo antártico utilizando PICRUSt2.....	31
Tabla 6.- Parámetros de calidad y concentración de las muestras de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica.....	37
Tabla 7.- Identificación de los miembros de la comunidad procarionte compartidos bajo una prevalencia del 80% a nivel de género entre el grupo de muestras cercanas (PUNTA) y lejanas (COLL) con respecto a la pingüinera.....	48
Tabla 8.- Identificación de los miembros de la comunidad procarionte compartidos bajo una prevalencia del 80% a nivel de género para las muestras PUNTA y COLL.....	50

Tabla 9.- Identidad y abundancia de microorganismos que presentan genes relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno a través de predicciones metagenómicas por medio de PICRUSt2.....62

Tabla 10.- Parámetros fisicoquímicos para las muestras de suelo antártico (réplica biológica 1).....66

Índice figuras suplementarias

Figura suplementaria S1. Integridad de las muestras de DNA provenientes de suelos antárticos en gel de agarosa 2%.....	96
Figura suplementaria S2.- Abundancia relativa promedio por sitio de las 15 taxa más abundantes a nivel de <i>phylum</i> en las muestras de suelo antártico.....	97
Figura suplementaria S3.- Abundancia relativa promedio por sitio de las 15 taxa más abundantes a nivel de clase en las muestras de suelo antártico.....	98
Figura suplementaria S4.- Abundancia relativa promedio por sitio de las 15 taxa más abundantes a nivel de género en las muestras de suelo antártico.....	99
Figura suplementaria S5.- Gel agarosa 1% corrido con productos de amplificación del gen <i>nifH</i> en muestras de DNA extraído desde suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica (incluye figura página anterior).....	101
Figura suplementaria S6: Identificación mediante HMMER/ <i>hmmScan</i> de secuencias proteicas obtenidas usando los partidores IGK3-DVV.....	102
Figura suplementaria S7.- Abundancia de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno a través de predicciones metagenómicas por medio de PICRUSt2.....	103
Figura suplementaria S8: Análisis de disimilitud basados en Jaccard.....	104
Figura suplementaria S9: Ensayos de actividad nitrogenasa (ARA).....	105

Índice de tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1.- Identificación y descripción de secuencias <i>nifH</i> de referencias.....	106
Tabla suplementaria S2.- Identificación de mejores hits vía BlastP de ASVs identificados en muestras de suelo.....	110
Tabla suplementaria S3.- Estadística asociada a índices de Alfa-Diversidad.....	118
Tabla suplementaria S4- Miembros de la comunidad procarionte compartidos según distancia a la pingüinera.....	119
Tabla suplementaria S5- Miembros de la comunidad procarionte compartidos entre los sitios PUNTA.....	120
Tabla suplementaria S6- Miembros de la comunidad procarionte compartidos entre los sitios COLL.....	122
Tabla suplementaria S7: PERMANOVA a análisis de distancia UniFrac ponderado.....	123
Tabla suplementaria S8.- Identificación de secuencias (ASVs y mejores hits en Blastp) según posicionamiento y taxonomía con respecto a árbol de referencia.....	124
Tabla suplementaria S9.- Identidad y abundancia de microorganismos que presentan genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno a través de predicciones metagenómicas por medio de PICRUSt2.....	126

Tabla suplementaria S10.- Resultados ANOVA para la significancia estadísticas de las variables fisicoquímicas que impactan la comunidad procarionte en el modelo construido mediante ordistep.....124

Abreviaturas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

cm: Centímetros

BSA: Albúmina de suero bovino

g: Gramos

h: Horas

HMM: *Hidden Markov Models* (Modelos ocultos de Markov)

INACH: Instituto Antártico chileno

kb: Kilobases

L: Litros

m: Metros

mg: Miligramos

kg: Kilogramos

min: Minutos

mL: Mililitros

μL: Microlitros

nm: Nanometros

NR: *Non Redundant* (Base de datos de proteínas no redundantes de NCBI)

°C: Grados Celsius

OTU: unidad taxonómica operacional

ASV: *Amplicon Sequence variant* (Variante de secuencia de amplicón)

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reaccion en cadena de polimerasa)

TP: fósforo total

TIP: fósforo inorgánico total

WHC: *water holding capacity* (capacidad de retención de agua)

DOC: *Dissolved organic carbon* (carbono orgánico disuelto)

Cmic: carbono microbiano

Nmic: nitrógeno microbiano

TDP: fosfato total

DN: nitrógeno disuelto

nmol: nano mol

M: molar

V: volts

KO: Kegg Orthology

RESUMEN

Los pingüinos transfieren (ej. mediante guano, huevos, etc) cantidades significantes de nutrientes y contaminantes desde el ecosistema marino al ecosistema terrestre. Las deposiciones de estas aves influyen fuertemente las propiedades fisicoquímicas del suelo, formando lo que se denomina como suelo ornitogénico, el cual es rico en nitrógeno combinado proveniente principalmente del guano en forma de ácido úrico. Estas condiciones pueden producir cambios en la estructura y composición de las comunidades microbianas de estos suelos, que son uno de los mayores reservorios de carbono y nitrógeno en el ecosistema antártico. En general, en los suelos sin influencia de pingüinos, el dinitrógeno (N_2) puede ser convertido en amoníaco (NH_3), en un proceso llamado fijación biológica de nitrógeno, el cual es realizado específicamente por los microorganismos denominados diazótrofos. Estos microorganismos presentan los genes *nif*, los cuales codifican para la enzima nitrogenasa, siendo el gen *nifH* el más conservado y por tanto utilizado como marcador de diversidad genética en estos organismos diazótrofos. En muchos de estos microorganismos, la fijación de nitrógeno es inhibida en presencia de altas concentraciones de NH_3 , por lo que los pingüinos podrían estar modulando la presencia y actividad de estas poblaciones a través de su contribución significativa al ingreso de nitrógeno combinado al ecosistema antártico.

En esta tesis se utilizó como modelo de estudio la colonia de pingüinos barbijo (*Pygoscelis antarctica*) ubicada en Punta Descubierta, Isla Decepción, Antártica, para evaluar el efecto de los pingüinos sobre las comunidades procariontes y en particular el gremio de organismos diazótrofos del suelo. Para ello, se delimitó un transecto de trabajo de aproximadamente 1200 metros de distancia desde la pingüinera, considerando la presencia de vegetación como un factor propio del suelo, y por ello tomándose muestras tanto de suelo desnudo como con patrón de vegetación, donde se determinó la

composición y estructura de la comunidad procarionte total, y el gremio de microorganismos diazotróficos en particular.

Los resultados obtenidos de esta tesis, determinan que la presencia de la pingüinera efectivamente puede influenciar la comunidad procarionte presente en estos suelos, donde principalmente la presencia de NH_4^+ y NO_3^- impactan notablemente la estructura de esta comunidad en el suelo más cercano a la pingüinera. En el sitio más influenciado por la colonia de los pingüinos se observa una mayor abundancia de Proteobacterias y Bacteroidetes, mientras que presentan una disminución en la abundancia relativa de Acidobacteria y Gemmatimonadetes, los cuales se mantienen abundantes en el resto de los suelos del transecto. Además, predominan miembros de las familias Chitinophagaceae y Rhodanobacteraceae que pueden estar cumpliendo un rol en el proceso de desnitrificación de este suelo (en especial *Rhodanobacter*). Finalmente, al evaluar particularmente el gremio de organismos diazotófos en estos suelos, se identifican secuencias anotadas como Nostocales, Frankiales, Burkholderiales y Clostridiales, que se encontraron en lugares específicos a lo largo del transecto. Algunas como los Clostridiales o Frankiales no están reportados en estudios antárticos previos como fijadores de nitrógeno, y por tanto su presencia se revela como una novedad en estos suelos. Los potenciales fijadores de nitrógeno observados en este estudio, se encuentran más abundantes en sitios a 200-300 metros de la pingüinera y no así en los sitios más distantes (400-1200 metros), reflejando una distribución no homogénea, donde los lugares intermedios (algunos con vegetación) reflejan el aumento de fijadores de nitrógeno, sugiriendo una mayor actividad de los mismos en estos suelos con menos aporte de nitrógeno combinado por parte de los pingüinos.

SUMMARY

Penguins transfer (eg through guano, eggs, etc.) significant amounts of nutrients and pollutants from the marine ecosystem to the terrestrial ecosystem. The depositions of these birds strongly influence the physicochemical properties of the soil, forming what is called ornitogenic soil, which is rich in combined nitrogen, mainly from guano in the form of uric acid. These conditions can produce changes in the structure and composition of the microbial communities of these soils, which are one of the largest carbon and nitrogen reservoirs in the Antarctic ecosystem. In general, in soils not influenced by penguins, dinitrogen (N_2) can be converted into ammonia (NH_3), in a process called biological nitrogen fixation, which is carried out specifically by microorganisms called diazotrophs. These microorganisms present the *nif* genes, which code for the nitrogenase enzyme, the *nifH* gene is the most conserved and therefore used as a marker of genetic diversity in these diazotrophic organisms. In many of these microorganisms, nitrogen fixation is inhibited in the presence of high concentrations of NH_3 , so the penguins could be modulating the presence and activity of these populations through their significant contribution to the entry of combined nitrogen to the Antarctic ecosystem.

In this thesis, the chinstrap penguin colony (*Pygoscelis antarctica*) located in Punta Descubierta, Deception Island, Antarctica, was used as a study model to evaluate the effect of penguins on prokaryotic communities and in particular the guild of diazotrophic organisms of the soil. To do this, a working transect of approximately 1200 meters of distance from the penguin colony was delimited, considering the presence of vegetation as a factor inherent to the soil, and therefore taking samples of both bare soil and with vegetation pattern, where we determinate the composition and structure of the total prokaryotic community, and the guild of diazotrophic microorganisms in particular.

The results obtained from this thesis determine that the presence of the penguin rookery can effectively influence the prokaryotic community present in these soils, where mainly the presence of NH_4^+ and NO_3^- notably impact the structure of this community in the

soil closest to the penguin rookery. In the site most influenced by the penguin colony, a greater abundance of Proteobacteria and Bacteroidetes is observed, while this site presents a decrease in the relative abundance of Acidobacteria and Gemmatimonadetes, which remain abundant in the rest of the soils of the transect. In addition, members of the Chitinophagaceae and Rhodanobacteraceae families predominate and may be playing a role in the denitrification process of this soil (especially *Rhodanobacter*). Finally, by particularly evaluating the guild of diazotrophic organisms in these soils, we identified sequences annotated such as Nostocales, Frankiales, Burkholderiales, and Clostridiales, which were found at specific location along the transect. Some, such as Clostridiales or Frankiales, are not reported in previous Antarctic studies as nitrogen fixers, and therefore their presence is revealed as a novelty in these soils. The nitrogen-fixing potentials observed in this study are more abundant in sites 200-300 meters from the penguin colony and not in the most distant sites (400-1200 meters), reflecting an not homogeneous distribution, where intermediate places (some with vegetation) reflect the increase of nitrogen fixers, suggesting a higher activity of the same in these soils with less combined nitrogen contribution from the penguins.

1.-Introducción

1.1.-Isla Decepción y el efecto del calentamiento global en Antártica

Una de las consecuencias más directas del calentamiento global generado en los últimos 50 años, es el aumento de la temperatura en la Antártica (Hansen *et al.*, 2010). Estimaciones han demostrado una aceleración en la pérdida de la capa de hielo antártico, donde el 75% de las plataformas de hielo han ido retrocediendo progresivamente durante la última mitad de este siglo (Rignot *et al.*, 2013), atribuido directamente al aumento de la temperatura (Paolo *et al.*, 2015, Wouters *et al.*, 2015, Bokhorst *et al.*, 2019). Este fenómeno repercute especialmente en la Península Antártica y el arco de Escocia, los cuales se enfrentan a los cambios ambientales y calentamiento más rápidos del mundo (Convey *et al.*, 2019; Turner *et al.*, 2014). Sin embargo, cuando se evalúan los efectos que tiene el calentamiento global sobre el ecosistema antártico terrestre, este tiene aspectos tantos positivos como negativos (Torres-Mellado *et al.*, 2011, Convey *et al.*, 2019). Por un lado, se favorece la acumulación energética que está disponible para la biota (Siegert *et al.*, 2019), como también, el aumento en la disponibilidad de agua, especialmente a nivel de cambios en el grado de precipitación en la zona, favoreciendo la formación de suelos (Bronseleer *et al.*, 2018), y mediante cambios en el suplemento de nutrientes, entre otros, que favorecen la colonización de diversos organismos (Lee *et al.*, 2017). Sin embargo, esto también puede conducir al agotamiento de los nutrientes que vuelven a estas áreas menos aptas para las comunidades, afectando a miembros claves que son parte de la red trófica de este ecosistema (Robinson *et al.*, 2018, Atkinson *et al.*, 2004).

Dentro de estas zonas de alto impacto ocasionadas por el calentamiento global, en el norte de la Península Antártica encontramos la Isla Decepción. Ubicada en las Islas Shetland del Sur, es un activo estratovolcán con una larga caldera colapsada en donde las más recientes erupciones volcánicas se desarrollaron entre 1967 y 1970 (Smellie *et al.*, 2002). En algunos lugares de esta isla, hay presencia de fumarolas y anomalías en la temperatura del suelo debido a la continua actividad volcánica, además de una temperatura promedio anual del aire a nivel del mar cercano a los -2°C (Vieira *et al.*, 2008). Esta isla tiene

una fuerte influencia marina y altas temperaturas que alcanzan valores de 100°C cercano a las fumarolas activas (Muñoz-Martín *et al.*, 2005). Isla Decepción está cubierta principalmente por glaciares, lo que genera que existan gradientes de temperaturas en distancias muy cortas (Bendia *et al.*, 2018). Por otro lado, existen fuertes gradientes de salinidad desde los glaciares hasta las fumarolas, ya que estas últimas están ubicadas en la zona intermareal. Además de la temperatura y la salinidad, existen gradientes geoquímicos generados por las emisiones continuas de gases volcánicos, lo cual genera un mosaico de condiciones ambientales que afectan a los suelos de origen volcánico de Isla Decepción (Bendia *et al.*, 2018). Por otro lado, esta isla es colonizada por diversos animales, entre ellos encontramos la presencia de pingüíneras, principalmente de la especie barbijo (*Pygoscelis antarctica*), de las cuales existen ocho colonias de pingüinos ubicadas a lo largo de la costa exterior de la isla, las cuales se han visto reducidas en su población a consecuencia del cambio climático (Barbosa *et al.*, 2012), modificando el rol ecológico que cumplen en este ecosistema.

1.2.-Importancia de los pingüinos en la formación de suelos en Antártica

Las zonas libres de hielo en la antártica terrestre representan menos del 0,4% del continente (Ugolini *et al.*, 2008), y son generalmente zonas de baja temperatura, en donde el suelo es mayoritariamente pobre en humedad, carbono y nitrógeno (Aislabie *et al.*, 2009). Estos suelos antárticos se caracterizan por sus condiciones hostiles tanto para la vida vegetal como animal, donde sólo unos pocos han podido colonizar y sobrevivir (Chong *et al.*, 2012). Por otro lado, las líneas costeras en Antártica, permiten la transferencia de nutrientes mediante la deposición animal como un elemento clave en el enriquecimiento de estos suelos. Entre ellos, las aves de mar que usualmente colonizan estas áreas transfieren cantidades significativas de nutrientes y contaminantes desde el ecosistema marino al ecosistema terrestre, a través de sus heces, huevos, presas, cascarón, entre otros (Ellis *et al.*, 2005). En particular, las deposiciones de los vertebrados marinos fuertemente influyen las propiedades fisicoquímicas del suelo, formando un ecosistema terrestre enriquecido en nutrientes (Tatur, 2002). De hecho, estos suelos, también llamados suelos ornitogénicos, son descritos como una fuente importante de carbono y nitrógeno en el

ecosistema antártico (Burkins *et al.*, 2000). El enriquecimiento de estos suelos a causa de las deposiciones de animales promueve un incremento en la biomasa microbiana y en su actividad enzimática general. En este proyecto de tesis, nos enfocaremos en la acción que tienen los pingüinos barbijo (*Pygoscelis antarctica*) en el ecosistema terrestre antártico de Isla Decepción.

En Antártica, la especie de pingüinos barbijo se ha visto altamente afectada por las consecuencias del cambio climático, donde particularmente en Isla Decepción, se ha identificado una disminución en su población, reportada en función del número de sus nidos (Barbosa *et al.*, 2012). De 5500 nidos en el año 1990 se ha pasado a contabilizar 2500 nidos en el año 2007, siendo reportados como factores determinantes de este proceso, el cambio climático que trae consigo tanto el desajuste de la dinámica temporal en los ciclos biológicos de estas aves, como también la reducción de las poblaciones de krill antártico (*Euphausia superba*), que son elementos esenciales de la dieta de esta especie de pingüino (Barbosa, 2011, Atkinson *et al.*, 2004).

Los pingüinos se alimentan en mar abierto, pero se reproducen, mudan y descansan en tierra. Así, la producción primaria del fitoplancton marino es transferida en la cadena alimenticia en forma de krill antártico (Caut *et al.*, 2012), para luego ser transformado y eliminado en el sistema terrestre por los pingüinos en forma principalmente de ácido úrico (Lindeboom *et al.*, 1984). La descomposición de este compuesto, conduce a un enriquecimiento de amonio en el suelo, el cual puede ser transformado en nitrato por microorganismos del suelo mediante el proceso de nitrificación (Wright, 1995). Este proceso, es mediado principalmente por una rápida mineralización microbiana de las heces que ocurre en un periodo de una a tres semanas, donde el 50% del carbono y el 45% del nitrógeno se volatiliza a la atmósfera, mientras que el excremento se transforma en una masa uniforme, semi-líquida, con un rango de C: N: P comparable a la materia orgánica de la superficie del suelo (Tatur, 2002). El material particulado producto de la mineralización puede lixiviar en el mismo sitio, o mediante lluvias escurrir a zonas más alejadas de la pingüinera (Hutchinson, 1950). Así, los suelos ornitogénicos se forman principalmente gracias a esta actividad microbiana (bacteriana), mientras que el rol de otros organismos

(hongos y vegetación) está restringido principalmente a la zona marginal de los nidos de pingüinos (Smykla *et al.*, 2007). Se estima que tanto para la población de *Pygoscelis adeliae* como para *Pygoscelis antarctica* depositan anualmente un aproximado de un millón de toneladas de excremento seco en Antártica (Tatur, 2002). Esta cantidad corresponde a un estimado de 15.000-20.000 toneladas de fósforo y representa una parte importante en la participación global que tienen las aves en la transferencia de este elemento desde el mar a la tierra (Hutchinson, 1950). Sin embargo, una gran proporción de los nutrientes que llegan al suelo mediante los pingüinos retorna al mar, ya sea porque hay una mineralización parcial del guano o por medio de la volatilización de éste (Lindeboom *et al.*, 1984). Llevando esto a datos concretos, bajo condiciones favorable solo aproximadamente un 11% del fósforo se queda en el suelo (Tatur, 2002). El aumento desmesurado de fósforo en suelos ornitogénicos puede inhibir el crecimiento microbiano, lo cual podría repercutir en la diversidad de bacterias puesto que solo permitiría el crecimiento y actividad de algunos grupos especializados (Tscherko, *et al.*, 2003). Otro componente importante, es la alta abundancia de compuestos nitrogenados en las pingüineras. Por ejemplo, Espejo *et al.*, 2017 realizaron un análisis de composición de suelos ornitogénicos para la isla Ardley, donde determinaron que en los sitios de anidamiento, la presencia tanto de NO_3^- como NH_4^+ eran de 246,94 y 4570,5 mg kg^{-1} respectivamente, mientras que en los sitios control, los valores de composición disminuían a 8,29 y 276,35 mg kg^{-1} , respectivamente. Este mismo estudio obtuvo para suelos ornitogénicos cercanos a la Base Arctowski en la Isla Rey Jorge, valores para NO_3^- y NH_4^+ de 103,68 y 5845,2 mg kg^{-1} respectivamente en muestras provenientes de la pingüinera, mientras que para zonas sin influencia animal, obtuvo 71,49 y 311,9 mg kg^{-1} respectivamente. Este aumento de aproximadamente 17 veces más nitrógeno en los suelos provenientes de la pingüinera, están en concordancia con otros estudios (Chong, *et al.*, 2009), siendo de esta manera el nitrógeno uno de los componentes más abundantes en estos suelos, lo que hace que estos asentamientos animales sean la principal reserva de nitrógeno en los ecosistemas terrestres antárticos. Es por estos motivos, que la actividad que tienen los pingüinos es fundamental para la creación y mantención de la biodiversidad en la biota terrestre de la Antártica (Bokhorst *et al.*, 2019).

La rol que cumplen los ecosistemas ornitogénicos terrestres tienen efectos en cientos e incluso miles de años para la zona continental de la Antártica, siendo más corto para su zona marítima, ya que la influencia de humedad y lluvias permite arrastrar estos sedimentos, como también disolverlos (Tatur, 1997). De esta manera, los pingüinos son capaces de influenciar las propiedades del suelo, lo cual repercute sobre el ecosistema antártico en su totalidad.

1.3.-Rol ecológico de los pingüinos en Antártica

Una parte importante del rol ecológico que tienen los pingüinos es directamente sobre la vegetación antártica. Smykla et al. 2007, caracterizaron la vegetación asociada a las colonias de pingüinos en la Isla Rey Jorge, en la Antártica marítima. En esta investigación se estudiaron por zonas de acuerdo con el patrón de vegetación que existe, en relación con la distancia a la colonia de los pingüinos. Se observó, que en la zona que albergaba a los pingüinos, no existía casi presencia de vegetación. Este patrón cambiaba a lo largo del transecto de estudio, encontrándose adyacentemente a la pingüinera una cubierta vegetal dominada por el alga verde *Prasiola crista*, para luego generarse una transición del patrón de vegetación, identificando principalmente una zona con parches cubiertos por el pasto (*Deschampsia antarctica*) y el clavelito antártico (*Colobanthus quitensis*). Finalmente, en la zona más distante de la colonia de pingüinos, describieron una alta abundancia de líquenes y musgos. Las especies de musgos encontrados corresponden a *Polytrichastrum alpinum*, *Syntrichia saxicola*, *Polytrichum piliferum*, *Sanionia georgico-uncinata* y *Brachythecium austrosalebrosom*. De esta manera, la tendencia general en lo que respecta al cambio de la estructura de la vegetación entre zonas consecutivas está marcada por la disminución en la abundancia de especies nitrófilas (que necesitan tierras ricas en nitrógeno para desarrollarse), con la simultánea aparición e incremento de especies que tienen un menor requerimiento de nitrógeno para desarrollarse. Ante esto, se puede inferir que existe un gradiente en la fertilidad derivado de los pingüinos, el cual es el mayor factor en la determinación del patrón de vegetación en cada zona. Así, la distribución de cada especie y consecuentemente la formación de una zona de vegetación particular, esta

probablemente relacionado principalmente con el grado de nutrientes derivados de pingüinos.

Por otro lado, varios estudios han evaluado la diversidad bacteriana en los suelos de Antártica influenciados por aves marinas utilizando técnicas de cultivo independientes, librería de clones y secuenciación masiva, entre otros (Aislabie *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2012, Guo *et al.*, 2018, Santamans *et al.*, 2017, Ramírez-Fernández *et al.*, 2019). A partir de esto, se ha determinado que la microbiota también se ve modificada de acuerdo al ingreso de nutrientes al sistema por parte de los desechos de pingüino. Recientemente, Ramírez-Fernández *et al.*, 2019, utilizando análisis del gen 16S rRNA mediante secuenciación masiva, determinaron la influencia que tienen tanto las aves marinas como los pinípedos, vía modificación de las características edáficas en la diversidad de bacterias del suelo en cabo Shirreff, Antártica. Se obtuvieron para *Pygoscelis antarctica*, que el porcentaje de lecturas de secuencias de 16S rRNA en orden decreciente a nivel de filos más abundantes en muestras de suelo fue Proteobacteria (62,6%), Bacteroidetes (18,7%), Deinococcus-Thermus (4,9%), Actinobacteria (4,5%), Acidobacteria (3,8%) y Firmicutes (1,1%). Esto difiere de lo observado en el grupo control, en donde se presentaron en orden decreciente Proteobacteria (31,5%), Actinobacteria (17,5%), Acidobacteria (13,8%), Gemmatimonadetes (11,2%), Bacteroidetes (6,7%) y Firmicutes (1,1%). A niveles taxonómicos más bajos, en los suelos bajo influencia animal, las OTUs (operational taxonomic unit, por sus singlas en inglés) más abundantes corresponden a *Rhodanobacter* y *Ectothiorhodosinus*, en contraste con las altas abundancias en los grupos controles de Gemmatimonas y Acidobacterias (principalmente *Gp4* y *Gp6*). Este cambio a nivel de la composición taxonómica en los suelos bajo influencia animal es similar a lo reportado por Guo *et al.*, 2018, donde examinaron cómo el excremento de pingüino afecta el microbioma del suelo, encontrándose que los filos más enriquecidos en función de la abundancia relativa son Proteobacterias (33,36%), Actinobacteria (19,88%), Gemmatimonadetes (15,21%), Acidobacteria (9,17%), Chloroflexi (7,23%), Verrucomicrobia (1,77%) y Firmicutes (1,48%). Mientras, a niveles taxonómicos inferiores, se encontró que las taxa más abundantes en la pingüinera correspondían a *Rhodanobacter* y miembros de la familia

Clostridiaceae. Especialmente los Firmicutes, han sido reportados como una de las taxa que son más abundantes en los suelos ornitogénicos en Antártica, en comparación con suelos sin influencia animal (Santamans *et al.*, 2017). El origen es la transferencia directa tanto de Firmicutes como Bacteroidetes, desde el intestino de estas aves, las cuales entre ambas dominan el 90% de la abundancia en este órgano (Barbosa *et al.*, 2016). Por otro lado, la alta abundancia del género *Rhodanobacter* (Gammaproteobacteria), en varios de estos estudios relacionados con influencia de los pingüinos sobre la microbiota terrestre (Aislabe *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2015, Guo *et al.*, 2018, Ramírez-Fernández *et al.*, 2019), estaría relacionado principalmente con funciones metabólicas. Los miembros de este género *Rhodanobacter* presentan un metabolismo anaerobio facultativo, que en ausencia de oxígeno, crecen usando nitrato, nitrito y óxido nitroso como aceptor de electrones, y de esta forma exhiben una completa desnitrificación (Prakash *et al.*, 2012). En este proyecto de tesis nos centraremos en evaluar el rol que tienen los pingüinos barbijo (*Pygoscelis antarctica*) sobre la comunidad procarionte en los suelos cercanos a la pingüinera de barbijos localizada en Punta Descubierta en Isla Decepción, Antártica.

1.4.- Comunidades microbianas en suelos de Isla Decepción

El conocimiento básico de la diversidad bacteriana en la Antártica es actualmente limitado, a pesar del reconocimiento que los procesos microbianos subyacen al funcionamiento de todos los ecosistemas, y que la microbiota es a menudo el componente dominante y a veces único de los ecosistemas antárticos (Convey 2001). Se han reportado relativamente pocos estudios de diversidad bacteriana antártica terrestre en comparación con organismos multicelulares (Chong, *et al.*, 2009). Aunque ha habido una mayor atención a la investigación de las comunidades microbianas en los últimos años, la cobertura espacial de los estudios de diversidad terrestre sigue siendo muy limitada. Dentro de este contexto, resulta interesante investigar cómo la presencia de pingüinos está afectando la diversidad microbiana en Isla Decepción, teniendo en consideración la particularidad de este ecosistema, basado en suelos volcánicos con presencia de gradientes de temperatura, que son capaces de modular la biota presente en estos suelos. Chua *et al.* 2018, realizaron una línea base de la diversidad microbiológica en suelos desnudos sin incidencia animal ni

vegetal en esta isla. En este trabajo se partió de una concentración promedio de DNA que fue de 6,1 µg/g de suelo, lo cual es un valor relativamente bajo teniendo en consideración que se trata de una muestra de suelo. Ahora bien, el grueso del estudio permitió identificar los filos de bacterias en Isla Decepción que en orden descendiente en relación con su abundancia relativa son: Proteobacteria (18,22%), Actinobacteria (12,53%), Bacteriodetes (4,87%), Verrucumicrobia (4,65%), Acidobacteria (4,45%) y Chloroflexi (2,22%). Los patrones de heterogeneidad en las comunidades bacterianas del suelo a niveles taxonómicos más bajos (género y especie) son más evidentes que a niveles taxonómicos más altos (como filos), ya que las especies bacterianas son más sensibles a los factores espaciales y ambientales (Green *et al.*, 2006). De igual manera, en Isla Decepción los seis géneros más abundantes fueron *Sphingomonas*, *Ferrimicrobium*, *Flavobacterium*, *Marmoricola*, *Nitrospira* y *Arthrobacter*, siendo el primero de estos el predominante. Esto puede ser debido a la habilidad que tiene *Sphingomonas* para sobrevivir en ambientes bajos en nutrientes inherentes a Antártica (Stomeo, *et al.*, 2012). Basados en estos antecedentes, queremos evaluar cómo los pingüinos son capaces de modificar la comunidad procarionte en este ecosistema, teniendo en consideración que alteran la composición fisicoquímica y biológica del suelo a través de su excreción (Chong, *et al.*, 2009, Guo, *et al.*, 2018). A partir de lo anterior, y considerando el alto aporte de nutrientes (especialmente nitrógeno combinado) que es transferido a estos suelos, en esta tesis también buscamos evaluar cuál sería el efecto particular que tendrían estos pingüinos sobre la microbiota que conduce las dinámicas del nitrógeno en este ecosistema. Se pondrá un especial énfasis en los microorganismos capaces de incorporar nitrógeno gaseoso al ecosistema (organismos diazotófos) para entender de qué manera se están viendo influenciados por este ingreso de nutrientes (alto en nitrógeno combinado) generado por estas aves marinas.

1.5.-Fijación de nitrógeno y microorganismos diazotróficos en Antártica

El nitrógeno es un elemento esencial que está contenido en diversas biomoléculas necesarias para sustentar la vida. Este elemento es abundante en la atmósfera de la tierra en forma de gas dinitrógeno (N₂), aunque la mayoría de los organismos son incapaces de metabolizarlo a causa de que es relativamente inerte (MacKay, *et al.*, 2004). Por esta razón,

la mayoría de los organismos deben obtener el nitrógeno en su forma “fijada”, tales como son el amoníaco (NH_3) o nitrato (NO_3^-) (Canfield, *et al.*, 2010). Debido a que las formas fijadas de nitrógeno son continuamente secuestradas en los suelos, no quedando disponibles para el metabolismo, o continuamente convertidos a N_2 a través de la nitrificación y desnitrificación, la vida solo puede ser sostenida por la conversión de N_2 a NH_3 (Cheng, *et al.*, 2008). Este proceso es conocido como fijación de nitrógeno y es un paso crítico en el ciclo biogeoquímico de este elemento (Hoffman, *et al.*, 2014). La fijación de N_2 puede ocurrir en tres formas diferentes: 1) a través de un proceso geoquímico, como una tormenta eléctrica (relámpagos y rayos), 2) industrialmente a través del proceso de Haber-Bosch, o 3) de forma biológica mediante la actividad de la enzima nitrogenasa de organismos capaces de fijar N_2 , que son denominados diazotróficos. Estos microorganismos son uno de los grupos funcionales ecológicamente más importantes que existen, puesto que mediante la fijación de nitrógeno son capaces de proveer la fuente primaria de este elemento al ecosistema (Fowler, *et al.*, 2013, Angel, *et al.*, 2018). Los genes que codifican para la enzima nitrogenasa y que por tanto están involucrados en la fijación de nitrógeno son los llamados *nif*, encontrándose exclusivamente en los dominios Bacteria y Arquea (Angel, *et al.*, 2018, Boyd, *et al.*, 2015, Dos Santos, *et al.*, 2012).

Para todos los diazótrofos conocidos, la fijación biológica de nitrógeno es mediada por el complejo enzimático nitrogenasa, con aproximadamente 20 genes funcionales y regulatorios, los cuales están organizados en varios operones que en su conjunto se denominan el regulón Nif (Hoffman, *et al.*, 2014). De estos genes, el gen *nifH* codifica para la dinitrogenasa reductasa, el cual es considerado como uno de los genes más conservados de este regulón y el cual, tradicionalmente se ha utilizado como gen marcador para estudiar la diversidad genética de los microorganismos diazotróficos en la naturaleza (Gaby, *et al.*, 2011). El centro enzimático posee un clúster de Mo-Fe el cual es compartido por todos los diazótrofos conocidos, sin embargo, en algunas especies existen dos versiones alternativas de la nitrogenasa, la cual usa tanto VFe o FeFe como metales cofactores (Raymond, *et al.*, 2004). De igual manera que la forma canónica, estas formas alternativas catalizan la reacción de formación de amoníaco a partir de dinitrógeno.

Basados en análisis filogenéticos, el gen *nifH* usualmente forma cuatro clústeres denominados del I-IV (Gaby, *et al.*, 2012). La mayoría de las secuencias de *nifH* están dentro del clúster I, el cual está compuesto casi enteramente de secuencias provenientes de la nitrogenasa canónica MoFe. Este clúster contiene secuencias asociadas a Cianobacterias, Frankia, Proteobacterias y algunas relacionadas a Clostridia, Bacilli y Nitrospirae. Además, este clúster también contiene algunas secuencias provenientes de la nitrogenasa alternativa VFe (Hoffman, *et al.*, 2014). El clúster II, comprende la mayoría de las secuencias de la nitrogenasa VFe, como también todas las secuencias conocidas de la nitrogenasa alternativa FeFe. De igual forma, es posible encontrar algunos genes *nifH* de algunas arqueas (Gaby, *et al.*, 2012). El clúster III consiste principalmente en secuencias de *nifH* de bacterias anaeróbicas y arqueas tales como sulfato reductoras, espiroquetas, etc (Hoffman, *et al.*, 2014). El clúster IV hasta hace muy poco era considerado que contenía secuencias *nifH* no caracterizadas o no funcionales, pero Zheng *et al.*, 2016, identificaron una secuencia con una nitrogenasa funcional encontrada en el intestino de una termita.

Una revisión reciente realizada por Ortiz *et al.*, 2020 sobre los fijadores de nitrógeno presentes en suelos de Antártica señala que las cianobacterias juegan un rol fundamental como ingeniero ecosistémico en este ecosistema. Las cianobacterias son parte importante en el ciclo global del carbono, y gracias a su versatilidad en estrategias ecofisiológicas pueden prosperar en ambientes pobres en nutrientes como Antártica (Issa, *et al.*, 2014). Es usual encontrarlas asociadas a otros organismos, ya sea de manera simbiótica o epífita, o también formando tapetes microbianos sobre diferentes sustratos como nieve, hielo, suelo y rocas. Las cianobacterias diazotróficas también han sido descritas como una importante fuente de ingreso de nitrógeno en ambientes terrestres (principalmente en simbiosis con musgos y líquenes) y en agua dulce polar (Chapin *et al.*, 1992, Liengen 1992, Fernandez-Valiente *et al.*, 2001), siendo estas asociaciones las predominantes y algunas veces la única forma de vida encontrada en Antártica. Algunas cianobacterias como las del género *Nostoc*, tienen células especializadas denominadas heterocistos, donde no hay fotosíntesis y tiene lugar la fijación de N₂ (Issa, *et al.*, 2014). En bacterias heterotróficas, esta segregación de ambos procesos no es posible. Cianobacterias con heterocistos, predominantemente

Nostoc commune, conduce los procesos de fijación de nitrógeno en suelos antárticos (Ortiz *et al.*, 2020). Otras cianobacterias con heterocistos, incluyendo *Calothrix*, *Dichothrix*, *Nodularia* y *Hydrocoryne*, también pueden estar jugando un rol en el secuestro del nitrógeno en suelos y nichos asociados a rocas como hipolíticos y endolíticos (Komárek *et al.*, 2015, Van Goethem *et al.*, 2019, Makhalanyaane *et al.*, 2013). También se ha reportado que Burkholderiales (Betaproteobacteria) diazótrofos, pueden estar cumpliendo un papel importante en el ingreso de nitrógeno en suelos recientemente colonizados (Garrido-Benavent *et al.*, 2020). Otras taxa, incluyendo Actinobacterias del género *Streptomyces*, como de la familia Frankeniaceae o Chloroflexi, también están involucradas en la fijación de nitrógeno en suelos antárticos, sin embargo, su contribución cuantitativa es desconocida (de Scally *et al.*, 2016, Papale *et al.*, 2018). Estos estudios apoyan la conclusión de que la capacidad diazotrófica está muy extendida en suelos antárticos pobres en nutrientes. Sin embargo, el alcance y la importancia de las interacciones entre los taxones antárticos y su importancia en la diazotrofía no se encuentra completamente explorada, aunque a la fecha existe alguna evidencia de la cooperación entre cianobacterias y otros taxones, lo cual es esencial para completar el ciclo del nitrógeno en estos suelos (Van Dorst *et al.*, 2017, Ji *et al.*, 2017, Yergeau *et al.*, 2010).

Sin embargo, particularmente en los suelos influenciados por animales en Antártica, el panorama es diferente ya que las condiciones ambientales a nivel de nutrientes son muy diferentes en comparación con el resto de Antártica. En general, se sabe que el proceso ecológico de la fijación biológica de nitrógeno es sensible a altas concentraciones de oxígeno (a causa de que la enzima nitrogenasa se inactiva), así como también a un exceso de amonio y amoniaco que también inhibe el proceso (Hoffman, *et al.*, 2014). Esto sería el caso de los suelos ornitogénicos, caracterizado por un alto contenido de amonio (Tatur 2002). En este contexto, investigaciones recientes han demostrado que la actividad nitrogenasa es inhibida en la vecindad de las colonias de pingüinos, y que el mismo guano de los pingüinos es capaz de inhibir la fijación de nitrógeno en muestras sin previa influencia animal (Pérez, *et al.*, 2016). Por otro lado, Iannuzzi 2018, en su tesis observó que la abundancia del gen *nifH* se encuentra levemente disminuida en los suelos ocupados por

animales, comparado con un grupo control (sin influencia aparente de animales y/o plantas), aunque sin diferencias significativas. Esta disminución en la abundancia de este gen podría explicarse, a pesar de estar presente el marcador molecular, debido a que puede ser la actividad enzimática lo que se encuentra inhibida, por los altos niveles de nitrógeno presente en dichos suelos estudiados (Cabo Shirreff, Antártica). De igual forma, Ramírez-Fernández y colaboradores (comunicación personal), mediante análisis metagenómico de muestras impactadas por aves en la Isla Rey Jorge e Isla Livingston reportan números nulos de copias del gen *nifH* en los genomas ensamblados desde metagenomas (MAG, por sus siglas en inglés) recuperados de estas muestras. Sin embargo, también existen registros en la literatura de la presencia de Cianobacterias fijadoras de nitrógeno tales como *Phormyidium* que son abundantes en un ambiente rico en amonio (Smykla, *et al.*, 2007). Para estudiar este proceso de fijación biológica de nitrógeno, se han desarrollado técnicas que van desde el uso de isótopos (estables) de nitrógeno, como también el ensayo de reducción de acetileno (ARA, acetylene reduction assay, por sus siglas en inglés), los cuales permiten cuantificar la actividad nitrogenasa.

Cowan et al. 2011, estudiaron en las comunidades microbianas hipolíticas de Antártica (es decir, comunidades microbianas que se encuentran en la parte inferior de las rocas translúcidas) la capacidad de fijación biológica de nitrógeno mediante el ensayo de reducción de acetileno, reportando una actividad promedio que oscila entre 0,02-0,174 nmol N g⁻¹h⁻¹, mientras que en suelo desnudo no se detectó actividad nitrogenasa. De manera muy similar, Olson et al. 1998, analizaron el consorcio microbiano fijador de nitrógeno asociado a la capa de hielo en Lago Bonney (Antártica), donde a estos agregados de hielo se midió la actividad nitrogenasa mediante ARA en presencia y ausencia de luz, obteniendo valores de 0,02 nmol N g⁻¹h⁻¹ y 0,2 nmol N g⁻¹h⁻¹ respectivamente. El estudio de Olson *et al.*, 1998 indicaba la presencia tanto de microorganismos fototróficos (cianobacterias) y heterotróficos, los cuales podrían ser responsables de este proceso de fijación de N₂. Mientras, Davey, 1982 estudió la fijación *in situ* de nitrógeno en suelos cubiertos por musgos (*Bryum antarcticum*) y de *Nostoc* en Vestfold Hills, Antártica. Se obtuvo que las colonias de *Nostoc* registraron las tasas de fijación más altas (13,78 nmol N cm⁻² h⁻¹). Las

asociaciones de cianófitos de musgo húmedo que crecían en pendientes poco profundas mostraron tasas moderadas de reducción de acetileno ($3,98 \text{ nmol N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$), mientras que la vegetación seca fue la menos activa ($0,38 \text{ nmol N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Ahora bien, cuando investigamos en la literatura, a la fecha solo existe un reporte sobre el efecto que tienen los pingüinos sobre la fijación de nitrógeno en Antártica. Pérez, *et al.*, 2016, investigó el efecto que tiene el guano de pingüino papua (*Pygoscelis papua*) a lo largo de un transecto en Isla Ardey. En este trabajo, se realizó ensayos de reducción de acetileno *in situ*, tanto en la pingüinera, como en otros puntos, obteniendo en la pingüinera tasas de fijación de nitrógeno mínimas (cercasas a cero), mientras que a 1200 metros desde la pingüinera la tasa de fijación biológica de nitrógeno aumentaba a $0,86 \text{ nmol N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Para determinar si la baja tasa de fijación biológica de nitrógeno en la pingüinera está dada por la presencia del guano de los pingüinos, los puntos del transecto previamente mencionados fueron suplementados con este guano, y posteriormente se realizaron nuevos experimentos ARAs *in situ*. Los resultados mostraron que la presencia de este guano es capaz de inhibir la fijación biológica de nitrógeno completamente para todos los puntos del muestro. Por otro lado, y en concordancia con lo exhibido por Davey, 1982, la adición de agua en las muestras sin guano, son capaces de aumentar la tasa de fijación biológica de nitrógeno, siendo esto uno de los factores que influyen fuertemente este proceso en Antártica, considerando tanto el derretimiento de glaciares como las precipitaciones, posibles eventos que favorecen la fijación biológica de nitrógeno (Pérez *et al.*, 2016). Teniendo esto en consideración, a la fecha no se han realizados estudios de fijación de N_2 , ni de actividad nitrogenasa, ni tampoco se ha evaluado en detalle la diversidad de organismos diazótrofos en suelos de Isla Decepción. De igual manera, no se han realizado investigaciones en su conjunto para analizar el efecto de las pingüineras en Antártica, y en particular en Isla Decepción.

1.6.-Propuesta de investigación

Dada la influencia que tienen las colonias de pingüinos sobre las comunidades procariontes y sobre la vegetación, así como sobre los suelos a través de la formación de gradientes de nutrientes, con especial énfasis en la incorporación de compuestos

nitrogenados a este ecosistema pobre antártico, resulta interesante preguntarse cuál es el rol que tienen estas colonias de pingüinos sobre la comunidad procarionte en suelos de origen volcánico y en particular, sobre los microorganismos diazotróficos y su actividad en Isla Decepción. Es por esto que en esta tesis se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: “La estructura y composición de la comunidad procarionte presenta cambios en los suelos de Isla Decepción, Antártica, en función de la distancia a la pingüinera de *Pygoscelis antarctica*. En particular, los microorganismos diazotróficos aparecen a medida que disminuye el nitrógeno combinado en suelos bajo la influencia de la pingüinera de *Pygoscelis antarctica* en Punta Descubierta”. Caracterizar la influencia de estas colonias resulta trascendente, sobre todo teniendo en consideración que el calentamiento global está modificando la población de pingüinos en Antártica, lo que podría generar cambios en la entrada de nutrientes a los suelos, y con ello cambios en particular en la composición y actividad de sus comunidades microbianas, y en general de todo el ecosistema.

Con esta tesis pretendemos generar por tanto información novedosa de cómo los pingüinos y su contribución en forma de nutrientes a los suelos antárticos, cambia la estructura de comunidades microbianas y en particular aquellas con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2). De manera indirecta, a través de los resultados obtenidos en esta tesis, se podrían hacer proyecciones acerca de la influencia del calentamiento global sobre los microorganismos y en particular la actividad de organismos diazotróficos en suelos de Antártica. De esta forma se podrían estimar los futuros cambios en los patrones de vegetación y vida animal que pudiese sufrir este lugar debido al cambio en los ciclos biogeoquímicos de estos suelos.

2.-Hipótesis de trabajo

“La estructura y composición de la comunidad procarionte presenta cambios en los suelos de Isla Decepción, Antártica, en función de la distancia a la pingüinera de *Pygoscelis antarctica*. En particular, los microorganismos diazotróficos aparecen a medida que disminuye el nitrógeno combinado en suelos bajo la influencia de la pingüinera de *Pygoscelis antarctica* en Punta Descubierta”

3.-Objetivos

3.1.-Objetivo general

Determinar la estructura y composición de la comunidad procarionte y el gremio de microorganismos diazotróficos en suelos bajo la influencia de la pingüinera de *Pygoscelis antarctica* en Punta Descubierta, Isla Decepción, Antártica.

3.2.-Objetivos específicos

1) Determinar la estructura y composición de la comunidad procariota en suelos bajo la influencia de la pingüinera de *Pygoscelis antarctica* en Punta Descubierta, Isla Decepción, Antártica.

2) Determinar la estructura y composición del gremio de microorganismos diazotróficos en suelos bajo la influencia de la pingüinera de *Pygoscelis antarctica* en Punta Descubierta, Isla Decepción, Antártica.

3) Determinar los parámetros fisicoquímicos que afectan la comunidad procariota en suelos bajo la influencia de la pingüinera de *Pygoscelis antarctica* en Punta Descubierta, Isla Decepción, Antártica.

4.-Metodología

4.1.-Sitio de muestreo

Las muestras de suelo analizadas en esta tesis se tomaron durante una expedición a Isla Decepción, Islas Shetland del Sur, Antártica (S 62. 95298°, W 60. 63189°) (**Figura 1**), en el mes de enero del 2019 (Proyecto FONDECYT n° 1181745). En esta isla, el modelo de estudio es la pingüinera Punta Descubierta (S 62. 99041°, W 60. 72375°) y se trabajó con un transecto en función a la distancia desde esta colonia de pingüinos hasta la toma de muestras en el sitio Collado Vapor (S 62. 98659°, W 60. 72183°) (**Figura 2**). Dentro de este transecto, que comprende una distancia de aproximadamente 1,2 kilómetros, existe la presencia de patrones de vegetación que cubren zonas cercanas a la pingüinera, donde por este motivo y con el fin de no ignorar una característica propia de estos suelos, se tomaron muestras también de suelo bajo vegetación (**Figura 3**). Para la toma de muestras, se removió la capa superior y se colectaron 10 gramos de la fracción 0-10 cm de suelo. Las muestras obtenidas están tabuladas (**Tabla 1**) respecto a su localización geográfica (PUNTA: si son muestras provenientes de Punta Descubierta, y COLL: si son muestras provenientes de Collado Vapor), y según el patrón de vegetación que presentan (A: si son muestras bajo el alga *Prasiola crispa*; SU: si son muestras bajo el musgo *Sanionia uncinata*; PA: si son muestras bajo el musgo *Polytrichastrum alpinum*; BS: si son muestras bajo suelo desnudo (bare soil)). Cabe destacar que también se tomaron muestras que están bajo suelo desnudo pero cercanas a algún patrón de vegetación, las cuales se encuentran tabuladas como BS-SU (suelo desnudo cercano a *Sanionia uncinata*) y BS-PA (suelo desnudo cercano a *Polytrichastrum alpinum*). Para cada punto de muestreo (9 puntos en total) se tomaron tres réplicas biológicas, dentro de las cuales cada réplica biológica presenta además tres réplicas técnicas (81 muestras totales). Las muestras posteriormente fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

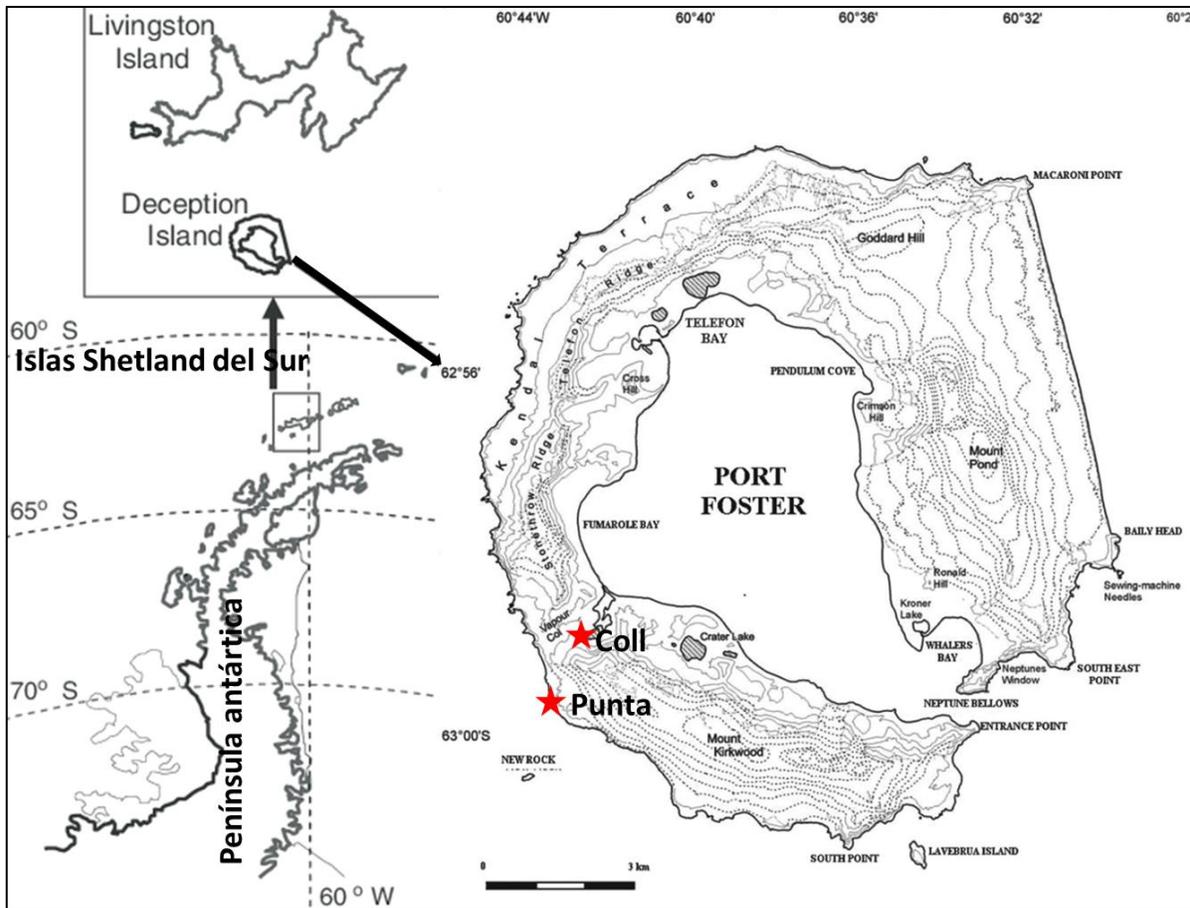


Figura 1.- Mapa de Isla Decepción, Islas Shetland del Sur, Península Antártica. Localización de los dos sitios inicial (Punta Descubierta S 62. 99041°, W 60. 72375°) y final (Collado Vapor S 62. 98659°, W 60. 72183°) del transecto de muestreo marcados con estrella roja en el mapa (Mapa modificado de Pereira y Puzke 2013).

Distancia con respecto
a la pingüinera (m)

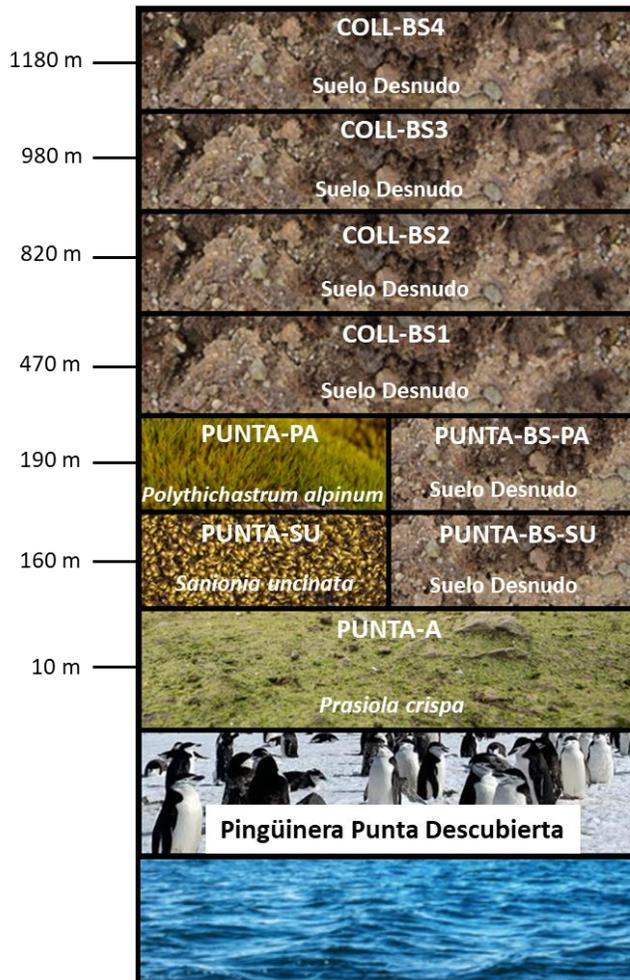


Figura 3.- Distribución de los sitios de muestreo en Isla Decepción, Antártica. A lo largo del transecto, existen diversos sitios, algunos con una cubierta de vegetación o con suelo descubierto. La muestra PUNTA-A presenta una cobertura vegetal dominada por el alga *Prasiola crispa*, en cambio PUNTA-SU está dominada por el musgo *Sanionia uncinata*, mientras que PUNTA-PA la cobertura vegetal está dominada por el musgo *Polytrichastrum alpinum*. Paralelo a estos puntos con presencia de musgos, se tomaron muestras de suelo desnudo cercanos a los sitios dominados por *Sanionia uncinata* (PUNTA-BS-SU) y *Polytrichastrum alpinum* (PUNTA-BS-PA). Finalmente, para las muestras de Collado Vapor, todas corresponden a suelo desnudo (COLL-BS).

Tabla 1.- Localización de los sitios de muestreo en Isla Decepción, Antártica durante la Expedición Científica Antártica ECA55.

Nombre muestra	Localización	Distancia desde la colonia (m)	Patrón de vegetación
PUNTA-A1	S 62.59424°, W 60.43425°	10 m	<i>Prasiola crispa</i>
PUNTA-A2	S 62.59424°, W 60.43425°	90 m	<i>Prasiola crispa</i>
PUNTA-A3	S 62.59424°, W 60.43425°	9 m	<i>Prasiola crispa</i>
PUNTA-SU1	S 62.59363°, W 60.43296°	157 m	<i>Sanionia uncinata</i>
PUNTA-SU2	S 62.59363°, W 60.43296°	215 m	<i>Sanionia uncinata</i>
PUNTA-SU3	S 62.59363°, W 60.43296°	60 m	<i>Sanionia uncinata</i>
PUNTA-PA1	S 62.59361°, W 60.43127°	188 m	<i>Polytrichastrum alpinum</i>
PUNTA-PA2	S 62.59361°, W 60.43127°	291 m	<i>Polytrichastrum alpinum</i>
PUNTA-PA3	S 62.59361°, W 60.43127°	63 m	<i>Polytrichastrum alpinum</i>
PUNTA-BS-SU1	S 62.59370°, W 60.43307°	144 m	Suelo desnudo
PUNTA-BS-SU2	S 62.59370°, W 60.43307°	215 m	Suelo desnudo
PUNTA-BS-SU3	S 62.59370°, W 60.43307°	60 m	Suelo desnudo
PUNTA-BS-PA1	S 62.59361°, W 60.43128°	185 m	Suelo desnudo
PUNTA-BS-PA2	S 62.59361°, W 60.43128°	291 m	Suelo desnudo
PUNTA-BS-PA3	S 62.59361°, W 60.43128°	63 m	Suelo desnudo
COLL-BS1.1	S 62.98660°, W 60.72174°	457 m	Suelo desnudo
COLL-BS1.2	S 62.98660°, W 60.72174°	491 m	Suelo desnudo
COLL-BS1.3	S 62.98660°, W 60.72174°	300 m	Suelo desnudo
COLL-BS2.1	S 62.98313°, W 60.71923°	808 m	Suelo desnudo
COLL-BS2.2	S 62.98313°, W 60.71923°	868 m	Suelo desnudo
COLL-BS2.3	S 62.98313°, W 60.71923°	631 m	Suelo desnudo
COLL-BS3.1	S 62.98241°, W 60.71604°	971 m	Suelo desnudo
COLL-BS3.2	S 62.98241°, W 60.71604°	1048 m	Suelo desnudo
COLL-BS3.3	S 62.98241°, W 60.71604°	765 m	Suelo desnudo
COLL-BS4.1	S 62.98097°, W 60.71362°	1175 m	Suelo desnudo
COLL-BS4.2	S 62.98097°, W 60.71362°	1118 m	Suelo desnudo
COLL-BS4.3	S 62.98097°, W 60.71362°	880 m	Suelo desnudo

Se representan las localizaciones para los diferentes sitios muestreados, incluyendo las tres réplicas biológicas, además de la distancia con respecto a la pingüinera Punta Descubierta y tipo de patrón de vegetación que presenta la capa superior del suelo.

4.2.-Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se extrajo a partir de 1 gramo de muestra de suelo utilizando el kit de extracción DNeasy PowerSoil (Qiagen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente, el DNA fue almacenado en *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8,0) y conservado a -80 °C. Luego de obtenido el DNA, se cuantificó utilizando el fluorómetro Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Inc.), la calidad (relación Absorbancia 260 nm / Absorbancia 280 nm) se evaluó mediante espectrofotometría a través del equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y finalmente la integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X (Tris-HCl 40mM, Ácido acético 20mM, EDTA 1 mM) a voltaje constante (110V) durante 30 min.

4.3.-Identificación de la presencia del gen 16S rRNA y *nifH* mediante PCR en muestras de suelos antárticos

Para la amplificación de los genes 16S rRNA y *nifH* se realizaron PCRs, donde para el gen 16S rRNA se utilizaron los partidores 358F-907R (Weidner *et al.*, 1996) que cubren la región V3-V4 de este gen (**Tabla 2**); mientras que para el gen *nifH* se utilizaron las parejas de partidores universales PolF-PolR (Poly, *et al.*, 2001), IGK3-DVV (Gaby *et al.*, 2012) y Ueda19F-R6 (Angel *et al.*, 2018). De igual forma, se evaluó la presencia de cianobacterias fijadoras de nitrógeno mediante el uso de partidores específicos CNF-CNR (Díez *et al.*, 2012). Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo a un volumen final de reacción de 25 µL, incluyendo 2,5 µL de 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl) (Thermo Fisher Scientific, Inc.), 0,2 µL de Taq Polymerase® (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y 0,4 µM de cada partidor. Además se utilizó 1 ng de DNA genómico para cada reacción (**Tabla 3 y Tabla 4**). Los ciclos de PCR para cada set de partidores están representados en la **Tabla 4**. Los productos de PCR fueron mezclados con *buffer* de carga 6X que incluye GelRed® DNA stain (Biotium) y luego para la detección de estos productos PCR, se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se realizó una corrida electroforética en *buffer* TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, Ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) a voltaje constante (110V) durante 30 min.

Tabla 2.- Partidores utilizados para identificar la presencia del gen 16S rRNA y *nifH* en muestras de DNA de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica

Gen objetivo	Nombre partidor: Secuencia (5'-3')	Tamaño Amplicón (pb)	Referencia
16S rRNA	358F: 5' AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT 907R: 5' GCCCCCGTCAATTCMTTTRAGTTT	549 pb	Weidner <i>et al.</i> , 1996
<i>nifH</i>	CNF: 5' CGTAGGTTGCGACCCTAAGGCTGA CNR: 5' GCATACATCGCCATCATTTCCAC	374 pb	Díez <i>et al.</i> , 2012
	PolF: 5' TGCGAYCCSAARGCBGACTC PolR: 5' ATSGCCATCATYTCRCCGGA	361 pb	Poly <i>et al.</i> , 2001
	IGK3: 5' GCIWHTAYGGIAARGGIGGIATHGGIAA DVV: 5' ATIGCRAAICCCRCRAIACIACRTC	394 pb	Gaby <i>et al.</i> , 2012
	Ueda19F: 5' GCIWTYTAYGGIAARGGIGG R6: 5' TCIGGIGARATGATGGC	454 pb	Angel <i>et al.</i> , 2018

Tabla 3.- Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de PCR según pareja de partidores usados para identificar la presencia del gen 16S rRNA y *nifH* en muestras de DNA de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica

Reactivo	Volúmenes añadidos para cada pareja de partidor (μL)				
	358F- 907R	PolF- PolR	IGK3- DVV	Ueda19F- R6	CNF- CNR
Agua	17,8 μL	17,8 μL	17,4 μL	17,4 μL	17,8 μL
Buffer 10X PCR (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl)	2,5 μL	2,5 μL	2,5 μL	2,5 μL	2,5 μL
Mg ⁺² (50 mM)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
dNTPS (10 mM)	0,5 μL	0,5 μL	0,5 μL	0,5 μL	0,5 μL
Primer Forward (10 μM)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Primer Reverse (10 μM)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Taq polimerasa (5 U/ μL)	0,2 μL	0,2 μL	0,2 μL	0,2 μL	0,2 μL
BSA (20 ng/ μL)	-	-	0,4 μL	0,4 μL	-
DNA (1 ng/ μL)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Volumen Final	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL

Tabla 4.- Programas de PCR para la amplificación de genes 16S rRNA y *nifH* según pareja de partidores en muestras de suelo de Isla Decepción, Antártica

Pareja Partidores	DI			D			A			E			EF		
	n° ciclos	t (min)	T (°C)												
358F-907R ^a	1	5	95	30	0,5	95	30	1	60	30	1	72	1	5	72
PolF-PolR ^b	1	5	95	35	1	95	35	1	57	35	1	72	1	7	72
IGK3-DVV	1	5	94	35	0,5	94	35	1	52	35	0,5	72	1	10	72
Ueda19F-R6	1	5	94	35	0,5	94	35	1	52	35	0,5	72	1	10	72
CNF-CNR	1	15	95	35	1	94	35	1	50	35	1	72	1	7	72

Para las abreviaturas; DI: Desnaturalización inicial, D: Desnaturalización, A: Alineamiento, E: Elongación, EF: Elongación final.

^a: Para la pareja de partidores 358F-907R se hizo un PCR Touchdown con una disminución de 1°C por ciclo en el alineamiento de los primeros 8 ciclos hasta alcanzar la temperatura de 52°C.

^b: Para la pareja de partidores PolF-PolR se hizo un PCR Touchdown con 5 ciclos de alineamiento a 57°C y posteriormente una disminución de 1°C por ciclo hasta alcanzar la temperatura de 55°C.

4.4.-Clonamiento del gen *nifH*

Los productos de PCR obtenidos usando los partidores IGK3-DVV para la muestra PUNTA-PA, se purificaron usando el kit UltraClean PCR Clean-up (Qiagen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Posteriormente, los productos de PCR limpios se clonaron siguiendo el protocolo descrito en Cifuentes *et al.*, 2019. Brevemente, para este clonamiento se utilizó el kit pGEM-T-Easy Vector System (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor. Luego, con este vector se transformaron bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y se cultivaron en agar LB en presencia de ampicilina. Las colonias transformadas obtenidas, fueron seleccionadas y se comprobó la inserción del amplicón mediante PCR utilizando la pareja de partidores M13 (5'd[GTAAAACGACGGCCAG]3') (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Finalmente, se extrajeron los plásmidos de las colonias que presentan la inserción del producto de PCR en este vector, utilizando el kit de minipreparación de plásmidos GeneJET™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.), siendo almacenados a -80°C hasta su posterior envío a secuenciación.

4.5.-Secuenciación masiva de los genes 16S rRNA y *nifH*

Posteriormente, y después de lograr obtener material genético que cumpla con los parámetros solicitados por el centro de secuenciación, se llevó a cabo la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA, mediante la tecnología Illumina Mi-Seq en Argonne National Laboratory, Illinois (81 muestras totales). Para la secuenciación del gen *nifH*, se enviaron amplicones de este gen a partir de muestras de DNA obtenidos para el sitio PUNTA-PA (mezcla de las réplicas) que fueron generados utilizando tanto los partidores PolF-PolR y Ueda19F-R6, y secuenciados en el centro de secuenciación Mr.DNA (Texas, Estados Unidos) utilizando la misma tecnología Illumina. Por otro lado, se enviaron a secuenciar mediante tecnología Sanger en Macrogen (Korea), 13 plásmidos (clones) con secuencias de producto PCR del gen *nifH* obtenidos mediante el uso de los partidores IGK3-DVV para la muestra del sitio PUNTA-PA1. El cambio del centro de secuenciación se debe a facilidades económicas, metodológicas y de tiempos de procesado de muestras que tiene cada centro.

4.6.-Asignación taxonómica de las secuencias de 16S rRNA y análisis de diversidad y composición

El proceso de asignación taxonómica para el gen 16S rRNA se realizó utilizando el software Qiime2, versión qiime2-2020.2 (Boylen *et al.*, 2011). Aproximadamente, 4.006.668 secuencias crudas generadas en la secuenciación fueron demultiplexadas utilizando Qiime2. La identificación de la calidad de secuencias se hizo a partir de un archivo FastQC, obtenido mediante Qiime2 y visualizados mediante Qiime2-viewer. Para el proceso de limpieza de las secuencias se consideró un *Phread* estimado de 30. Este proceso junto con la obtención de “*Amplicon sequence variant (ASV’s)*”, se hizo utilizando DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). En esta tesis, se trabajó con ASVs, de manera que los OTUs en los resultados hacen referencia a secuencias 100% idénticas (zOTU; zero-radius OTU). La clasificación taxonómica se realizó usando como referencia la base de datos de 16S rRNA de SILVA versión r138.1 (arb-silva.de). Cabe mencionar que como filtro de calidad, se aplicó que cada muestra presentara un número mayor a 1000 cuentas. De esta forma, de las 81 muestras, solo 1 muestra (COLL4.2.3) no cumplía con esta condición, fue descartada (80/81 muestras >1,000 lecturas). Se eliminaron los ASVs asignados como mitocondrias y cloroplastos mediante Qiime2 utilizando la herramienta qiime taxa filter-table y qiime taxa filter-seqs.

Para el análisis de Alfa-diversidad, los índices calculados (n° observado de OTUs, Goods Coverage, índice Chao1 e índice de Shannon) se obtuvieron utilizando la herramienta “Alpha-diversity” en Qiime2. Dentro de esta herramienta, y a causa de que la mayoría de las métricas de diversidad son sensibles a las diferentes profundidades de secuenciación a lo largo de las diferentes muestras (especialmente cuando se evalúa la riqueza), se realizó un submuestreo aleatorio para cada muestra, considerando una profundidad de muestreo uniforme de 1000 cuentas por muestra. Posteriormente, los índices calculados fueron graficados en función del sitio al que pertenecen, utilizando el paquete de R ggplot2. Luego, se evaluó la normalidad de las métricas calculadas mediante una prueba Shapiro y se evaluó la existencia de diferencias significativas entre muestras mediante una prueba Krustal-Wallis. Finalmente, para identificar entre qué grupo específicos (sitios) hay diferencia

significativa, se realizó una prueba Pairwise Wilcox, ajustando los p-valores mediante FDR, dentro del paquete R Vegan versión 2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2019).

A partir de las tablas de cuentas y la taxonomía asociada obtenida mediante Qiime2, se hicieron gráficos de abundancia relativa a nivel de *phylum* mediante el paquete de R ggplot2. Posteriormente, y con el fin de evaluar la presencia de los taxa que son dominantes en cada sitio o a lo largo de todo el transecto, se hicieron análisis de ocurrencia en función de la abundancia relativa a nivel de las 20 familias más abundantes presentes en más o igual al 1% de las muestras mediante el paquete de R Ampvis2 (Andersen *et al.*, 2018).

Para evaluar la diferencia entre la diversidad de especies presente en cada sitio, se realizaron análisis de beta-diversidad. Para ello, se utilizó el paquete de R Phyloseq (McMurdie *et al.*, 2013) y Vegan, calculándose la distancia UniFrac, la cual se basa en la fracción de longitud de ramas compartidas entre dos comunidades dentro de un árbol filogenético, construido a partir de las secuencias provenientes del gen 16S rRNA para todas las comunidades que están siendo comparadas (Lozupone *et al.*, 2007). En este caso, con el UniFrac ponderado (weighted UniFrac,) las longitudes de las ramas son ponderadas basadas en la abundancia relativa de las taxa dentro de las comunidades, siendo esto graficado mediante el paquete de R ggplot2. Se evaluaron si la distribución de las muestras reflejadas en el UniFrac ponderado difieren significativamente entre sí mediante análisis de ANOVA permutacional (PERMANOVA), utilizando la función adonis en Vegan. Mientras que para evaluar los miembros de la comunidad que son compartidos entre los sitios, se identificaron las taxa con una prevalencia del 80% (lo que significa que el 80% de estos taxa están presentes en todas las réplicas biológicas y técnicas de un sitio) utilizando el paquete de R Phyloseq. Posteriormente, se graficaron estos miembros compartidos entre sitios, a través de un diagrama de Venn utilizando el paquete de R VennDiagram (cran.r-proyect).

Finalmente, se evaluó la co-ocurrencia entre ASVs y los diversos parámetros fisicoquímicos calculados. A partir de las tablas de abundancia relativa, utilizando R Studio, se filtraron los ASVs que están sobre el 0,5% de abundancia. Para estos ASVs se exportaron los datos de abundancia relativa junto con los valores de los parámetros fisicoquímicos.

Para ambos se calculó el índice de Spearman utilizando el paquete de R e1071 v.1.7-3 (cran.r-project), y se corrigieron los p-valores mediante FDR. Luego se filtraron los datos que presentaban un rho de Spearman superior a 0,6 e inferior a -0,6 con un $p < 0,01$, y mediante el software Cytoscape versión 3.8.0 se graficaron las co-ocurrencias (cytoscape.org) mediante gráficos de redes.

4.7.-Identificación de secuencias *nifH*

Para el análisis de clones obtenidos a partir de los partidores IGK3-DVV, se seleccionaron los plásmidos secuenciados que incorporaron el amplicón *nifH* y que presentaron la calidad correcta mediante el software SnapGene (GSL Biotech LLC). Mientras, para las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación masiva mediante Illumina Mi-seq, utilizando las parejas de partidores PolF-PolR y Ueda19F-R6, se realizó el proceso de limpieza (*Trimming*) y clusterización de secuencias y obtención de ASVs mediante DADA2 por medio del software Qiime2. Posteriormente, estas secuencias nucleotídicas fueron traducidas mediante el software Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010). Para la identificación de secuencias que efectivamente corresponden al gen *nifH* se utilizó el pipeline de trabajo NifMAP (Angel *et al.*, 2018). En este pipeline, y utilizando hmmer/hmmerScan, las secuencias aminoacídicas son comparadas contra modelos ocultos de Markov descritos tanto para la dinitrogenasa reductasa (*nifH*), como para proteínas homólogas, tales como la protoclorofila reductasa (genes *bchX*, *chlL*, *bchL*) y la proteína de partición cromosomal (gen *parA*). Una vez obtenidas las secuencias identificadas como *nifH*, se realizó una reconstrucción filogenética con el fin de determinar la taxonomía asociada a estas secuencias.

Inicialmente se realizó un árbol filogenético de referencia con una topología definida, generando una nueva base de datos utilizando las indicaciones descritas en ARBitrator (Heller *et al.*, 2014) para obtener secuencias proteicas anotadas como la proteína dinitrogenasa reductasa (gen *nifH*) a partir del GenBank (NCBI). De esta manera, se obtuvieron un aproximado de 39.000 secuencias. Posteriormente, se filtraron las secuencias considerando una cobertura mínima del 80%, seleccionando secuencias con un largo mínimo de 280 aminoácidos, obteniendo un aproximado de 4.000 secuencias, además

de ser curadas de las secuencias correspondientes a procariontes no cultivados. Luego se agruparon estas secuencias usando CD-HIT (Huang *et al.*, 2010), con una identidad de secuencia del 90%, obteniendo un aproximado de 190 secuencias representativas, las cuales están anotadas con su número de acceso en la **Tabla suplementaria S1**. Posteriormente, se realizó un alineamiento de las secuencias de referencia utilizando MAFFT (Kato *et al.*, 2013). Luego, mediante SnapGene (GSL Biotech LLC) se curó manualmente este alineamiento de referencia. Se eliminaron los aminoácidos iniciales y finales que no alinean completamente entre todas las secuencias, con el objetivo de disminuir los *gaps* generados durante el alineamiento. Una vez obtenido un alineamiento curado de secuencias de referencia, se realizó la reconstrucción filogenética a partir de la inferencia filogenética de los árboles de parsimonia máxima (ML: maximum likelihood, por sus siglas en inglés) utilizando IQtree (Nguyen *et al.*, 2015), considerando un nivel de Bootstrap de 10.000. Finalmente, se visualizó esta reconstrucción filogenética mediante iTol (itol.embl.de) y se evaluó y determinó la topología en función de la taxonomía que presenta este árbol de referencia.

Con las secuencias obtenidas mediante la secuenciación masiva se realizó una búsqueda mediante Blastp (NCBI) de los mejores 10 *hits* (**Tabla suplementaria S2**) que presentan las secuencias contra la base de datos del nr (non-redundant, por sus siglas en inglés) y el RefSeq. Tanto las secuencias de estos *hits* como las secuencias obtenidas mediante la secuenciación corresponden a secuencias cortas (*query*, aproximadamente 140 aminoácidos de largo). Posteriormente, mediante MAFFT y utilizando la función *Keep alignment length* se alinearon estas secuencias cortas (*query*) contra el alineamiento de secuencias largas de referencia curado. Seguidamente, se realizó el posicionamiento filogenético de las secuencias *query* en el árbol de referencia mediante epa-ng (Barbera *et al.*, 2019). Luego este posicionamiento fue visualizado mediante iTol. Finalmente, a partir de los resultados obtenidos mediante el árbol filogenético se realizaron análisis de abundancia relativa a partir de la tabla de cuentas obtenidas mediante Qiime2 por medio del software Prism8 (GraphPad).

4.8.- Predicción bioinformática de la ocurrencia de genes del metabolismo del nitrógeno

A partir de las secuencias representativas de los ASVs obtenidos del análisis del gen 16S rRNA mediante Qiime2, y de la tabla de cuentas y taxonomía asociada a los mismos, se desarrollaron análisis diferenciales para la predicción de funciones metagenómicas utilizando el software PICRUST2 (Gavin *et al.*, 2020). Se utilizó la herramienta `picrust2_pipeline.py -stratified` señalando que la familia de genes predichas esté bajo la base de datos del KO (*KEGG ORTHOLOGY*, por sus siglas en inglés). Con el objetivo de evaluar los genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno, se seleccionaron genes relacionados en los procesos de desnitrificación, fijación de nitrógeno, oxidación de amonio y reducción del nitrato en forma asimilatoria y disimilatoria (**Tabla 5**). Posteriormente, mediante R se filtraron los genes de manera específica por sitio, se contabilizó la abundancia de estos genes y se estratificó por sitio de muestro, para luego ser graficados usando software Prism8 (GraphPad). Finalmente, se calculó la abundancia relativa de las taxa que presentan en mayor abundancia los genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno.

4.9.-Ensayos de reducción de acetileno (ARA)

Se determinó la actividad nitrogenasa en muestras de suelo mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA), siguiendo el protocolo desarrollado por Alcamán *et al.*, 2015. El suelo (1 g) fue colocado en viales de 10 ml a los que se añadió 15 µL de agua pre-filtrada, para posteriormente inyectarles 1 ml de acetileno libre de oxígeno. En estos ensayos se consideraron viales controles vacíos, sin muestra de suelo y sin inyección de acetileno, así como también viales control con suelo pero sin inyección de acetileno. Todos los viales fueron incubados por seis horas, siendo cada ensayo realizado en quintuplicado. Luego de la incubación, 4 ml del gas en la fase superior del vial fueron almacenados en *vacutainers* (Becton and Dickson), hasta el análisis del gas mediante cromatografía gaseosa realizado por el laboratorio de Biogeoquímica y aplicación de isotopos estables (LABASI) en la Pontificia Universidad Católica de Chile. Para determinar la concentración de etileno, se hizo por medio de cromatógrafo de gases (GC) Shimadzu 8A equipado con un detector FID (Flame Ionization Detector, por sus siglas en inglés).

Tabla 5.- Códigos KOs de los genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno para el análisis de muestras de suelo antártico utilizando PICRUSt2

KOs	Genes
Fijación de Nitrógeno	
K02588	<i>nifH</i> ; nitrogenase iron protein NifH
K02586	<i>nifD</i> ; nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain
K02591	<i>nifK</i> ; nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain
K00531	<i>anfG</i> ; nitrogenase delta subunit
Reducción de nitrato asimilatoria	
K00367	<i>narB</i> ; ferredoxin-nitrate reductase
K00372	<i>nasA</i> ; assimilatory nitrate reductase catalytic subunit
K00360	<i>nasB</i> ; assimilatory nitrate reductase electron transfer subunit
K00366	<i>nirA</i> ; ferredoxin-nitrite reductase
Reducción de nitrato disimilatoria	
K00362	<i>nirB</i> ; nitrite reductase (NADH) large subunit
K00363	<i>nirD</i> ; nitrite reductase (NADH) small subunit
K03385	<i>nrfA</i> ; nitrite reductase (cytochrome c-552)
K00374*	<i>narI, narV</i> ; nitrate reductase gamma subunit
K15876	<i>nrfH</i> ; cytochrome c nitrite reductase small subunit
Desnitrificación	
K00370*	<i>narG, narZ, nxrA</i> ; nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, alpha subunit
K00371*	<i>narH, narY, nxrB</i> ; nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, beta subunit
K02567*	<i>napA</i> ; periplasmic nitrate reductase NapA
K02568*	<i>napB</i> ; cytochrome c-type protein NapB
K00368	<i>nirK</i> ; nitrite reductase (NO-forming)
K15864	<i>nirS</i> ; nitrite reductase (NO-forming) / hydroxylamine reductase
K04561	<i>norB</i> ; nitric oxide reductase subunit B
K02305	<i>norC</i> ; nitric oxide reductase subunit C
K00376	<i>nosZ</i> ; nitrous-oxide reductase
Nitrificación	
K10944	<i>pmoA-amoA</i> ; methane/ammonia monooxygenase subunit A
K10945	<i>pmoB-amoB</i> ; methane/ammonia monooxygenase subunit B
K10946	<i>pmoC-amoC</i> ; methane/ammonia monooxygenase subunit C
K10535	<i>hao</i> (hydroxylamine dehydrogenase)

Asteriscos (*) indican los códigos KOs que son clasificados tanto en la categoría de reducción de nitrato disimilatoria y desnitrificación en la base de datos del KEGG.

4.10.-Determinación de los parámetros fisicoquímicos en las muestras de suelo antártico

El análisis de las muestras de suelo antártico se realizó en el laboratorio del Dr. Sebastian Dötterl, del ETH Zúrich, Suiza. Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos se realizó una mezcla de las réplicas técnicas de cada sitio, además de combinar material del suelo proveniente del sitio PUNTA-BS-SU y PUNTA-BS-PA. Solo para la réplica biológica 1 de cada sitio se realizaron análisis de los parámetros fisicoquímicos, la cual presenta los metadatos completos (**Tabla 11**). De esta forma, se trabajaron con 8 muestras de suelo totales.

Para la determinación del pH medido en cloruro de calcio (CaCl_2) se adicionó CaCl_2 0,01M en suelo seco, aplicando 10 minutos de agitación y seguido de una espera de 24 horas, para finalmente medir la suspensión con un pH-metro 713 (Metrohm, Zofingen, Switzerland).

Las muestras fueron analizadas para la presencia de metales totales (Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Si, Ti y Zr) utilizando ICP-OES (5100 ICP-OES, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) después de extracción con “agua regia” ($\text{HCl}:\text{HNO}_3$, 3:1, v:v, 2 horas a 120°C). La determinación de la textura del suelo, se hizo mediante la determinación del tamaño de partícula vía difracción de rayos-X (LS 13 320, Beckman Coulter, Brea, USA), donde las muestras de suelo fueron pesadas para una cantidad adecuada de opacidad ($\sim 0,7$ g), mientras que luego se adicionó 4 ml de 10% Na-hexametafosfato, aplicando agitación por 5 horas y posteriormente sonicación por 1 minuto previo al análisis. También se determinó la concentración total de carbono y nitrógeno, vía combustión total usando un analizador CN (Vario MAX Cube, Elementar Analysensysteme GmbH, Langenselbold, Germany). Por otro lado, la determinación del carbono orgánico disuelto (DOC, por sus siglas en inglés) y nitrógeno disuelto (DN; por sus siglas en inglés), se realizó extrayendo con 1M de KCl por 30 minutos, seguido de homogenización en agitador horizontal por 1 hora y filtrado a través de papel filtro Whatman 40. Finalmente se midió con un analizador TOC-L conectado a una unidad TNM-L (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany). Para la determinación de biomasa microbiana carbono-nitrógeno, se siguió el protocolo descrito en Vance *et al.*, 1987, que utiliza como método de extracción la fumigación con cloroformo. Las muestras fueron

almacenadas a 48°C en una atmósfera saturada en CHCl₃ (en un desecador de vacío), para posteriormente ser aireadas repetidamente para eliminar el CHCl₃ restante en la muestra, extrayendo el C y N y cuantificándolos de manera idéntica a lo descrito previamente para los depósitos de suelo. La diferencia entre extractos no-fumigados (es decir, suelo) y extractos fumigados (es decir, suelo más material microbiano) se tomó como C y N microbiano. Estas concentraciones se dividieron por 0,45 para tener en cuenta los efectos de sorción determinados en el protocolo descrito por Heuck *et al.*, 2015. La determinación de las concentraciones de NH₄⁺ y NO₃⁻, se realizó siguiendo el protocolo descrito en Hood-Nowotny *et al.*, 2010. Utilizando un lector de microplaca, se cuantificó colorimétricamente el nitrato y el amoníaco en los extractos de KCL (no-fumigados) según la reacción de VCl₃-/Griess y la reacción de Berthelot, respectivamente. Por otro lado, el fósforo total del suelo extraíble con ácido y el fósforo inorgánico total extraíble con ácido, se obtuvieron mediante un método de ignición (O`Halloran *et al.*, 2008) en alícuotas secadas al aire. Para ello, se calentó una alícuota de suelo a 550 °C durante 5 horas, y luego se extrajo con H₂SO₄ 0,5 M durante 16 horas en un agitador vertical. El fosfato en las soluciones de H₂SO₄ se cuantificó colorimétricamente en un fotómetro de microplaca (Tecan Infinite M200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria), utilizando el método de verde de malaquita (D'Angelo *et al.*, 2001). La diferencia de P extraíble con ácido inorgánico y total, permite determinar el P extraído con ácido orgánico. Por otro lado, el P inorgánico disponible se obtuvo mediante extracción con NaHCO₃ 0,5 M (pH 8,5) (30 minutos en agitador horizontal, relación suelo: solución 1:15, filtrado a través de papel de filtro Whatman 40). Se digirieron alícuotas de estos extractos con persulfato ácido en autoclave (90 minutos, 121 °C) para descomponer los compuestos orgánicos de P y obtener P total disuelto (Robertson *et al.*, 1999). Posteriormente, las muestras de ambos tratamientos se acidificaron al 10% con H₂SO₄ 2,75 M y el fosfato se cuantificó colorimétricamente con el método de verde de malaquita. La diferencia de P total disuelto y P inorgánico disponible será el P orgánico disponible. Por otro lado, el P inorgánico de biomasa microbiana se determinó mediante extracción por fumigación con cloroformo (igual que para CN anterior, siguiendo el protocolo para P descrito en Brookes *et al.*, 1982), se extrajo y cuantificó como se describe en este párrafo para P inorgánico

disponible. La diferencia de las alícuotas fumigadas (suelo + microbiano) y no fumigadas (suelo) se tomó como concentración de P microbiana inorgánica dividida por el factor de corrección 0,45. También se analizaron las razones $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ y $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ mediante espectrometría de masas de relación de isótopos acoplado a un analizador elemental de conversión de temperatura TC/EA-IRMS (Delta V Plus, Thermo Scientific, Waltham, USA). Se midió la capacidad de retención de agua (WHC, por sus siglas en inglés), para lo cual el suelo se colocó en un papel de filtro en embudo y se saturó con agua, sellándolo con parafilm (para evitar vaporación) y posteriormente se dejó reposar por 24 horas, para finalmente medir su masa.

4.11.- Evaluación del efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la comunidad procarionte

A partir de los metadatos obtenidos mediante el análisis fisicoquímico de las muestras de suelo, se realizaron análisis de tendencia de todas las variables calculadas. Utilizando los paquetes de R `dplyr` y `reshape2` (cran-proyect), se transformaron los datos a una matriz Euclidiana y se normalizaron los datos, siendo esto graficado mediante `heatmap` (R-studio). Por otro lado, con los datos obtenidos a partir de la secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo antártico y los metadatos, se realizaron análisis multivariados. Primero que todo, utilizando el paquete de R `vegan`, se normalizó la tabla de cuentas (transformada en abundancia relativa) para corregir un posible error estadístico asociado a especies poco representadas, esto se logró utilizando la transformación de Hellinger.

Los metadatos fueron estandarizados mediante la función de R `decostand`, usando como método la transformación "`standardize`", para luego hacer un análisis de correspondencia desviado (DCA, por sus siglas en inglés) y poder así definir el tipo de modelo de ordenación restringida a usar. Dependiendo de la longitud del eje del DCA, se evaluó utilizar un modelo unimodal (Análisis de correspondencia (CA)/ Análisis de correspondencia canónica (CCA)) o lineal (Análisis de componentes principales (PCA)/ Análisis de redundancia (RDA)). Para los datos obtenidos de la tabla de cuentas en función

de la abundancia relativa se utilizó un modelo de análisis de correspondencia canónica (CCA). Una vez definido el tipo de análisis a realizar se construyó un modelo en donde se definió el alcance del modelo superior e inferior, mediante la función de R studio *CCA*. También se construyó el modelo completo y el modelo nulo mediante la función *ordistep* considerando un número de permutaciones máximo de 999. Posteriormente, mediante ANOVA se evaluó la significancia estadística de este modelo. Luego, se realizó una prueba de permutación mediante ANOVA (999 permutaciones) evaluando la significancia estadística de cada variable ambiental (metadatos), además de determinar la existencia de co-multinealidad de estas variables mediante *viff.cca*. Finalmente, y basados en los resultados del ANOVA, se graficaron las variables medioambientales que significativamente ($p < 0,05$) impactan la comunidad procarionte y que no presentan co-multinealidad con otras variables.

5.-Resultados

5.1.- Obtención del DNA y parámetros de calidad del material genético proveniente de muestras de suelo de Isla Decepción, Antártica

Durante la expedición antártica 2019 a Isla Decepción, Islas Shetlands del Sur, Antártica, se tomaron muestras de suelo para determinar la composición y estructura de la comunidad procarionte presente en este ecosistema influenciado por la presencia de la pingüinera de pingüinos barbijo, Punta Descubierta (**Figura 1**). Para ello se extrajo el material genético de 81 muestras que corresponden a un transecto con 9 sitios de muestreo (**Figura 2**), trabajando con 3 réplicas biológicas y de cada réplica biológica 3 réplicas técnicas. Se determinó para las 81 muestras la concentración del DNA y sus respectivos parámetros de calidad (relación 260/280- 260/230) que están representados en la **Tabla 6**. Para los sitios más cercanos a la pingüinera (sitios PUNTA), se obtuvo una mayor concentración de DNA de muestra, especialmente en las muestras con presencia de musgos en la capa superior del suelo (sitios PUNTA-SU/PUNTA-PA). Mientras, para los sitios más lejanos a la pingüinera (sitios COLL-BS), la concentración es aproximadamente un orden de magnitud menor que para los sitios PUNTA. En términos de calidad, para el DNA las muestras COLL-BS, el elevado valor en la razón 260/280 podría dar cuenta de presencia de RNA contaminante. Mientras, para los sitios PUNTA esta razón fue menor a 1,6 lo que podría significar la presencia de proteínas y fenoles en el DNA purificado. Finalmente, cuando se evaluó la integridad del material genético mediante gel de agarosa al 2%, todas las muestras se observaron íntegras (**Figura suplementaria S1**).

Tabla 6.- Parámetros de calidad y concentración de las muestras de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica

Sitio	[Concentración] ng/ μ l	260/280	260/230
PUNTA-A	9,77 \pm 4,1	1,50 \pm 0,6	1,62 \pm 2,1
PUNTA-SU	15,99 \pm 8,7	1,53 \pm 0,6	1,43 \pm 1,1
PUNTA-PA	32,56 \pm 15,6	1,41 \pm 0,5	1,76 \pm 2,2
PUNTA-BS-SU	14,15 \pm 11,8	1,36 \pm 0,7	0,94 \pm 0,6
PUNTA-BS-PA	6,65 \pm 6,0	1,21 \pm 0,8	0,72 \pm 0,6
COLL-BS1	0,70 \pm 1,3	2,10 \pm 1,9	0,70 \pm 0,2
COLL-BS2	0,35 \pm 1,0	2,88 \pm 1,0	0,59 \pm 0,2
COLL-BS3	3,56 \pm 0,8	2,24 \pm 0,5	1,10 \pm 0,1
COLL-BS4	0,27 \pm 0,8	2,22 \pm 1,9	0,67 \pm 0,3

Se representan los valores promedio y desviación estándar (\pm) tanto de concentración y calidad considerando para cada sitio y sus correspondientes réplicas biológicas y réplicas técnicas.

5.2.- Identificación del gen 16S rRNA en muestras de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica

Para identificar la presencia de microorganismos procariontes en las muestras de suelo, se realizaron ampliaciones por PCR del gen 16S rRNA utilizando la pareja de primarios 358F-907R (**Tabla 2**), amplificando la región V3-V4 de dicho gen. Para todas las muestras de DNA obtenidos a partir del suelo antártico, se obtuvo amplificación del gen 16S rRNA (**Figura 4**), lo que nos permitió corroborar la ausencia de inhibidores de la PCR y la presencia de material genético proveniente de microorganismos procariontes en todas las muestras evaluadas en todos los sitios de muestreo y sus réplicas (81 muestras totales). En la figura 4 se representa la amplificación del gen 16S rRNA correspondiente a cada sitio y sus réplicas biológicas correspondientes (3 por cada sitio).

5.3.- Identificación taxonómica de secuencias del gen 16S rRNA obtenidos mediante secuenciación masiva y determinación de métricas de alfa diversidad

Una vez comprobada la presencia del gen 16S rRNA en las muestras de DNA de suelo antártico, y logrando obtener material genético que cumpla con los parámetros solicitados por el centro de secuenciación, se envió a secuenciar el gen 16S rRNA mediante la tecnología Illumina Mi-Seq en Argonne National Laboratory, Illinois. Se obtuvieron aproximadamente 4.006.668 lecturas crudas (*raw reads*) para las 81 muestras. Se aplicó un filtro de calidad mayor a 1000 cuentas, de manera que de las 81 muestras solo 1 (COLL-BS4.2.3) no cumplió con esta condición, por lo que fue descartada. El sitio PUNTA-A, presentó un menor valor promedio en el número observado de OTUs (179) (**Figura 5a**), en contraste con la muestra del sitio PUNTA-SU, el cual presenta el mayor valor promedio

(350). Cuando se evaluó la diferencia entre sitios, se obtuvo que el sitio PUNTA-A presenta diferencias significativas con respecto a todos los otros sitios, incluso con los sitios adyacentes a este (sitios PUNTA) (Pairwise Wilcox p-value < 0,05, **Tabla Suplementaria S3**). El estimador de cobertura de Goods (Good's coverage) mostró que las muestras están en el rango de 0,9994 a 1 (**Figura 5b**), indicando que en las muestras de menor valor (COLL-BS3), solo el 0,06% de las lecturas son de OTUs que aparecen una sola vez en esta muestra, por lo cual, estarían cubriendo exitosamente la mayoría de la diversidad procarionte en todas las muestras. Luego, para analizar la riqueza en las muestras se utilizó el índice de Chao1 (**Figura 5c**), donde el sitio PUNTA-A.3 y COLL-BS2.3 presentan los menores valores para este índice (149 y 132, respectivamente), mientras que los sitios COLL-BS1 y PUNTA-SU (530 y 639 respectivamente) presentan los mayores valores promedio. Luego cuando se evaluó la existencia de diferencias significativas mediante Pairwise Wilcox (p-value < 0,05, **Tabla Suplementaria S3**), se observó que el sitio PUNTA-A presenta diferencias significativas (p-value < 0,05) con respecto a todos los otros sitios, exceptuando el sitio G2 (p-value = 0,27). Posteriormente, para evaluar la diversidad se utilizó el índice de Shannon (**Figura 5d**), donde las muestras correspondientes al sitio PUNTA-A.3, presentan un menor índice (4,7), mientras que las muestras correspondientes a los sitios COLL-BS1 y PUNTA-SU, presentan los mayores valores (8,19 y 8,14 respectivamente). Finalmente, solo el sitio PUNTA-A presentaba diferencias significativas con respecto a todos los otros sitios (Pairwise Wilcox p-value < 0,05, **Tabla Suplementaria S3**).

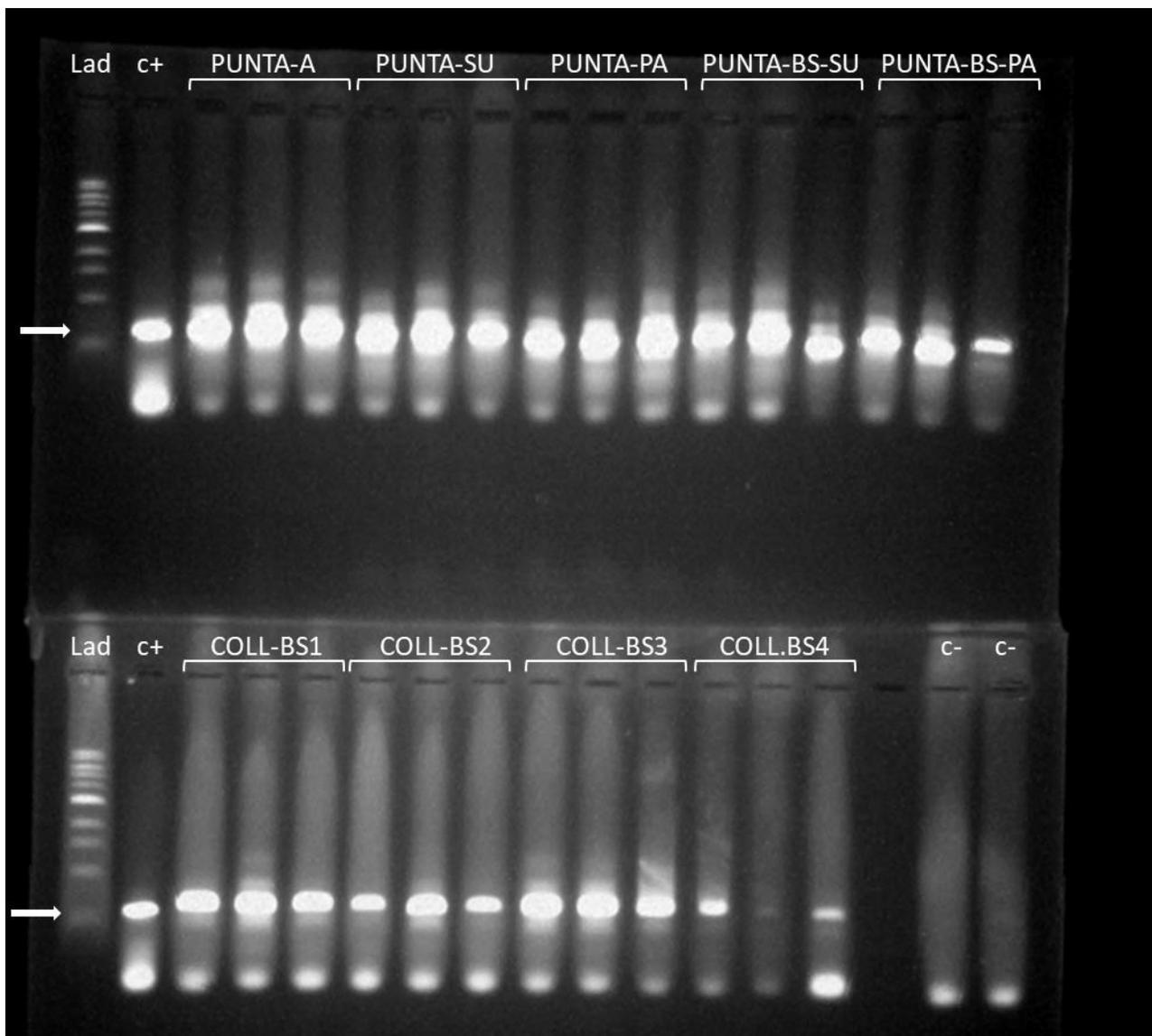


Figura 4.- Gel agarosa 1% corrido con productos de amplificación del gen 16S rRNA en muestras de DNA extraído desde suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica. Lad: Ladder 1kb, **c+:** control positivo (producto de PCR del gen 16S rRNA de *Fischerella termalis* CHP1.), **c-:** control negativo. Para cada sitio se representan los productos de PCR del gen 16S rRNA correspondientes a las 3 réplicas biológicas.

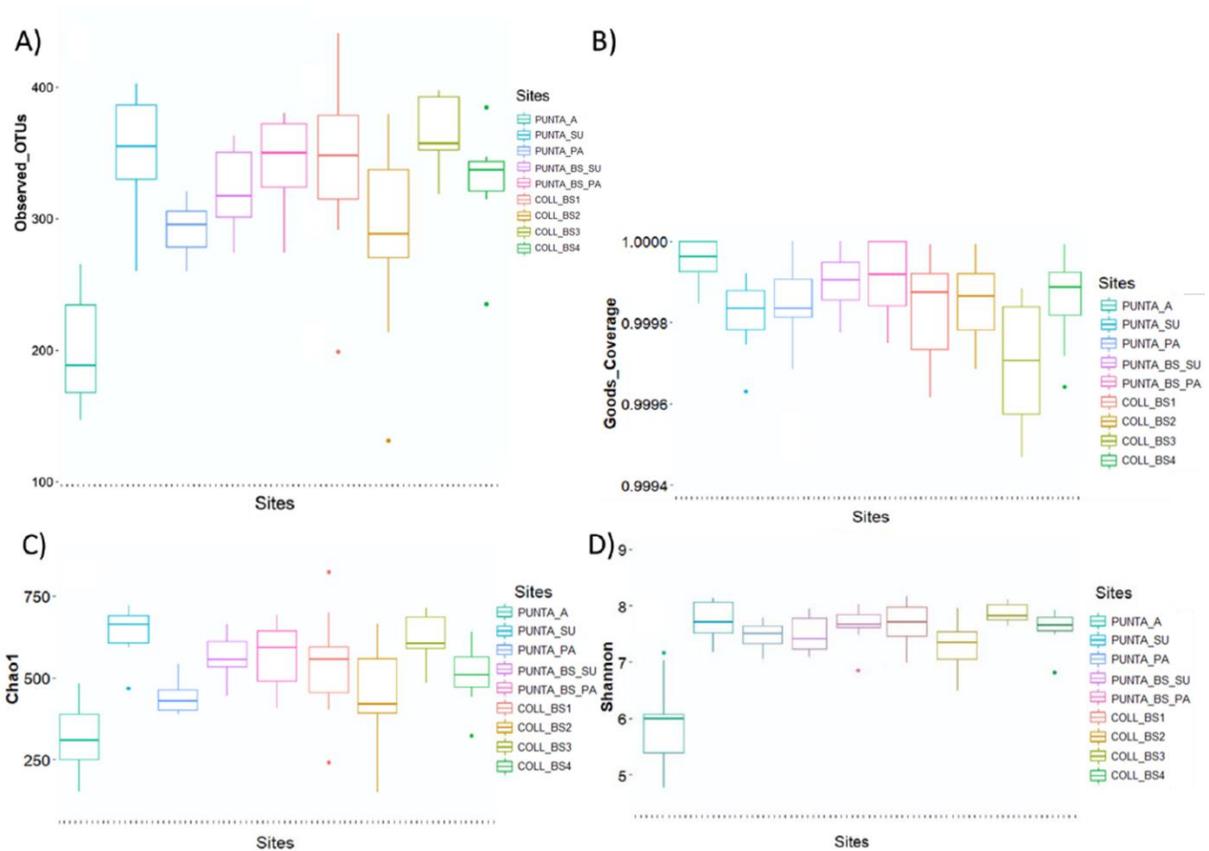


Figura 5: Índices de alfa-diversidad: A) Estimación del número de OTUs observados en las diferentes muestras, donde en promedio la muestra del sitio PUNTA-SU tiene el mayor número de OTUs observados (350), y la muestra del sitio PUNTA-A en promedio tiene el menor número de OTUs observados (179). B) Estimación de la Cobertura de Goods, donde las muestras varían en el rango de 0,9994 a 1, siendo los menores valores atribuidos a la muestra COLL-BS3. C) Estimación de la riqueza, mediante el índice de Chao1, donde la muestras que presentaron un menor índice corresponden a las del sitio COLL-BS2.3 (132) y PUNTA-A.3 (149), mientras que las muestras que presentan un mayor índice en promedio corresponden a las muestras del sitio PUNTA-SU y COLL-BS3. D) Estimación de la diversidad mediante el índice de Shannon, donde las muestras del sitio PUNTA-A.3 presentan el menor valor (4,7), mientras que las muestras del sitio COLL-BS1 y PUNTA-SU presentan valores mayores (8,19 y 8,14 respectivamente). Los puntos fuera del *boxplot* corresponden a valores *outliers*.

5.4.- Diversidad y composición de la comunidad procarionte en base a la distancia de la pingüinera

Para identificar cómo la presencia de la pingüinera afecta el microbioma del suelo, se evaluó la estructura general de la composición procarionte presente en estos suelos. Se realizaron análisis de abundancia relativa a nivel de *phylum* de la comunidad procarionte en las diferentes muestras a lo largo del transecto. En la **Figura 6**, se graficaron los 20 *phyla* más dominantes (en términos de abundancia relativa). Entre ellos, los más relevantes por abundancia relativa total (promedio en toda la comunidad) son: Proteobacterias (22,25%), Bacteroidetes (19,3%), Acidobacteria (14,7%), Gemmatimonadetes (10%), Actinobacteria (8,8%), Verrucomicrobia (7,7%), Chloroflexi (5,4%) y Planctomycetes (5,0%). Mientras que cuando se observa la composición a lo largo de todo el transecto de estudio se encuentran tendencias sobre la abundancia relativa de ciertos grupos taxonómicos en función a su distancia a la pingüinera (**Figura suplementaria S2**). Proteobacterias corresponden al *phylum* más abundante en la muestra más cercana a la pingüinera (PUNTA-A, 41,6%), de la misma forma que Bacteroidetes corresponde al segundo grupo taxonómico más abundante en el transecto total, y siendo en el sitio PUNTA-A en donde presenta la mayor abundancia relativa (35%) en este transecto. Por otro lado, el sitio PUNTA-A presenta los menores valores de abundancia relativa para los grupos taxonómicos Acidobacteria (3,5%) y Gemmatimonadetes (0,8%), en comparación con el resto de las muestras.

Cuando se evaluó la composición a niveles taxonómicos más bajos, encontramos que a nivel de clase, las más abundantes (**Figura suplementaria S3**) corresponden a: Bacterioidea (17,2%), Gammaproteobacteria (16,7%), Gemmatimonadetes (9,9%), Verrumicrobiae (7,7%) y Alfabroteobacteria (4,9%). La muestra más cercana a la pingüinera (PUNTA-A) presenta los mayores valores en abundancia relativa de las clases Bacterioidea (35%) y Gammaproteobacteria (39,8%). Mientras, a menores niveles taxonómicos como el de familia, predominan los procariontes no cultivados (**Figura suplementaria S4**), identificando Bacteroidetes_uncultured (11,3%), Gemmatimonadetes_uncultured (9,0%), Acidobacteria_uncultured (5,3%), Proteobacteria_rhodanobacter (4,7%), Verrucomicrobia_Candidatus_Udaeobacter (4,1%) como más abundantes.

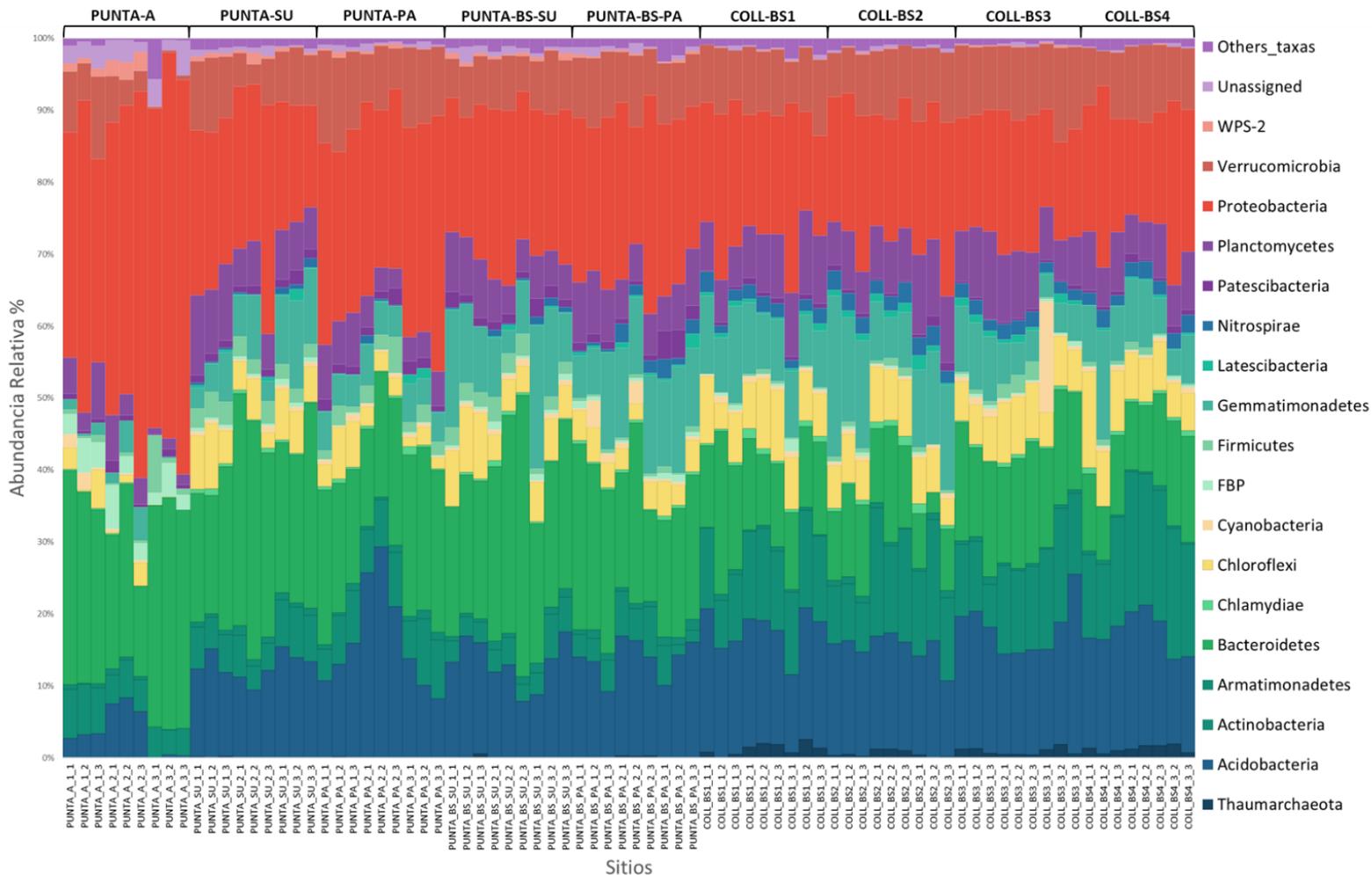


Figura 6.- Abundancia relativa de las 20 phyla más abundantes en las muestras de suelo antártico. A partir de la abundancia relativa, se graficaron los 20 *phyla* que se encuentran en mayor abundancia a lo largo del transecto. En la figura se representan 80 de las 81 muestras totales de las cuales se determinó su taxonomía y posterior abundancia. En la parte superior de la figura se encuentran identificadas a que muestra corresponde. Para la identificación porcentual de la abundancia relativa de cada grupo taxonómico ver **Figura suplementaria S2**.

5.5.- Ocurrencia de los miembros de la comunidad procarionte en las muestras de suelo antártico

Tomando en consideración el análisis anteriormente descrito, se evaluó la ocurrencia de los miembros de la comunidad procarionte en función a su abundancia relativa. Lo anterior, con el objetivo de evaluar las taxa que se mantienen dominantes a lo largo de todo el transecto (taxa exitosas), o para identificar la aparición de taxa altamente abundantes para un sitio en particular (taxa exitosa en cada sitio). Para ello, inicialmente se consideró el nivel taxonómico más bajo posible que presente una mayor resolución (por ejemplo a nivel de familia, donde se obtuvo un bajo número de familias asignadas como *uncultured*). De esta manera, en la **Figura 7** se graficaron las 20 familias más abundantes que se encuentran presentes con mayor o igual al 1% en abundancia relativa en las muestras. La familia Chitinophagaceae está presente a lo largo del transecto, con una abundancia relativa promedio de 12,8%, sin embargo, la presencia de esta taxa se encuentra sobrerrepresentada en el sitio PUNTA-A (31,4%) cercano a la pingüinera. La familia Rhodanobacteraceae, también es particularmente abundante en el sitio PUNTA-A (36,5%) en comparación con el resto de los sitios de muestreo (1,3%). Por otro lado, la familia Gemmatimonadaceae se encuentra en menor abundancia (0,8%) para el sitio PUNTA-A que en el resto de los otros sitios, donde esta taxa se mantiene altamente abundante (11,0%).

Luego, mediante el análisis de prevalencia de taxa para cada muestra, se evaluaron los miembros de la comunidad procarionte que son compartidos entre muestras. Inicialmente se evaluaron cuáles eran los miembros compartidos (**Tabla suplementaria S4**) tanto por las muestras que son cercanas (PUNTA) a la pingüinera, comparándolos con los miembros presentes en las muestras ubicadas en Collado Vapor (COLL). Utilizando una prevalencia del 80% (es decir, que la taxa se encuentra en el 80% de las muestras de un sitio específico o conjunto de sitios), inicialmente se evaluó los miembros compartidos a nivel de ASV. Sin embargo, al evaluar si estos ASVs se mantienen presentes en todos los sitios PUNTA, no se

observó ningún miembro compartido (datos no mostrados), de igual forma que para los sitios COLL. Contrariamente, a nivel de género, para el conjunto de muestras cercanas a la pingüinera (PUNTA) se observaron 23 miembros compartidos, mientras que para las muestras lejanas a la pingüinera (COLL) se observó hasta 52 miembros compartidos, compartiéndose además 9 miembros entre el grupo de muestras PUNTA y COLL (**Figura 8**). Posteriormente, se identificaron estas taxa compartidas entre ambos grupos de muestras, las cuales pertenecen a los *phyla* Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gammaproteobacteria y Bacteroidetes (**Tabla 7**). De manera similar a lo anterior, se evaluaron los miembros compartidos para los sitios PUNTA bajo una prevalencia de un 80% (**Tabla suplementaria S5**), a nivel de género y para cada sitio se identificaron: 10 miembros compartidos en PUNTA-A, 66 miembros compartidos en PUNTA-SU, 52 miembros compartidos en PUNTA-PA, 57 miembros compartidos en PUNTA-BS-SU y 38 miembros compartidos en PUNTA-BS-PA. Posteriormente se identificaron 3 miembros compartidos entre todos los sitios PUNTA (**Figura 9**), siendo estos asignados como Firmicutes, FBP (Abditibacteriota) y Bacteroidetes (**Tabla 8**). Finalmente, se realizó el mismo análisis para los sitios COLL, bajo una prevalencia del 80% (**Tabla suplementaria S6**) a nivel de género y para cada sitio se identificaron: 46 miembros compartidos para COLL-BS1, 39 miembros compartidos para COLL-BS2, 70 miembros compartidos para COLL-BS3 y 53 miembros compartidos para COLL-BS4. Posteriormente, se identificaron 16 miembros compartidos entre todos los sitios COLL (**Figura 10**), siendo estos asignados como Acidobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Nitrospirae y Planctomycetes (**Tabla 9**).

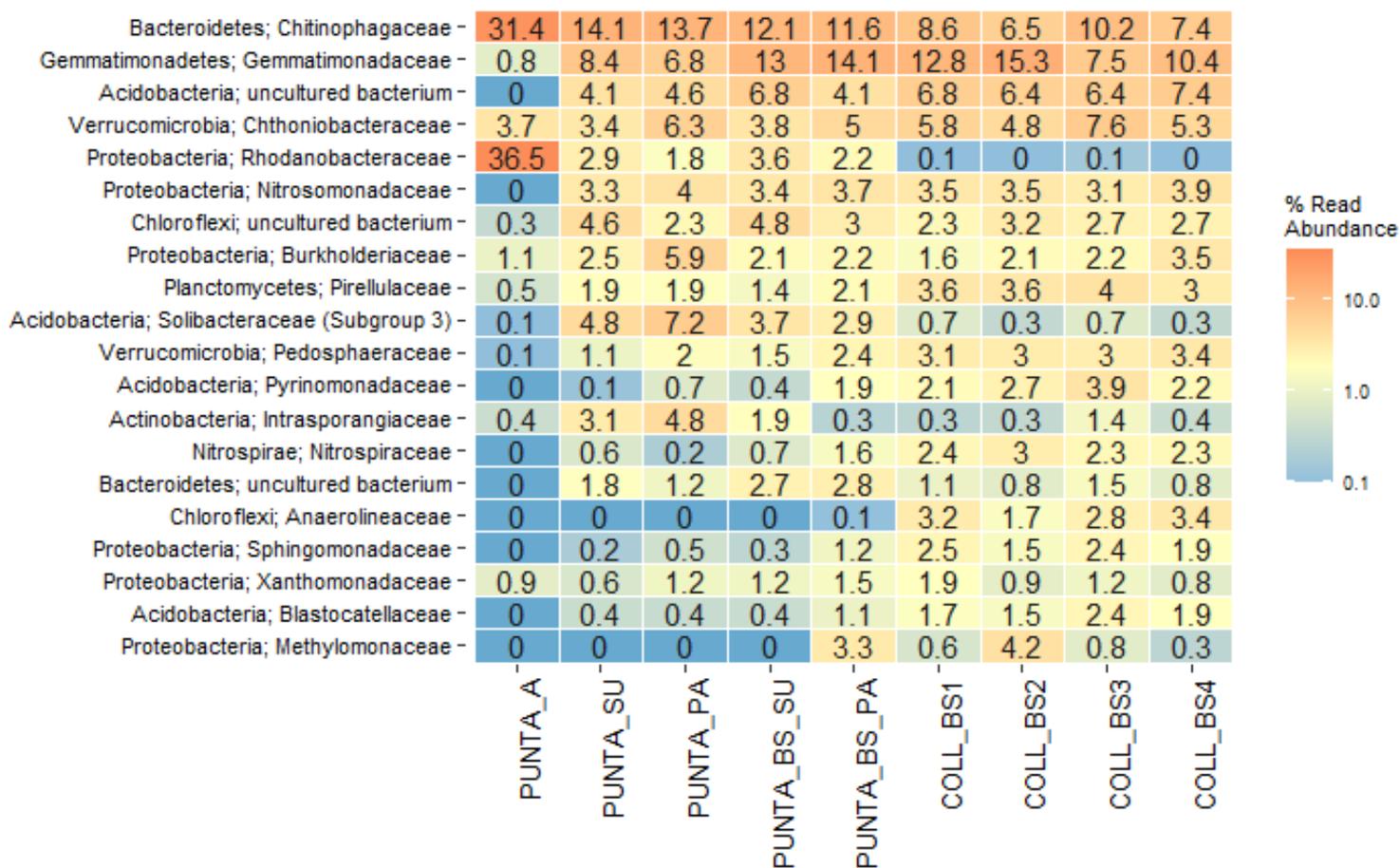


Figura 7.- Ocurrencia de los miembros de la comunidad procarionte a nivel de las 20 familias más abundantes en muestras de suelo antártico. A partir de los valores de abundancia relativa, se seleccionaron las 20 familias más abundantes que representan más del 1% en la comunidad total. La familia Chitinophagaceae y Rhodanobacteraceae son altamente abundantes en las muestras correspondientes al sitio PUNTA-A.

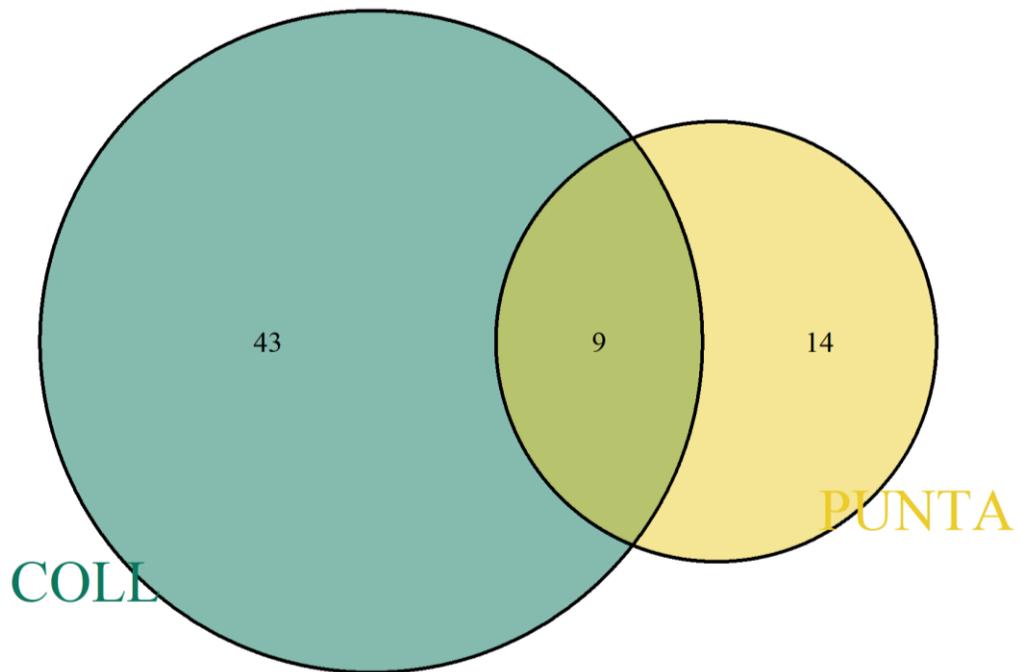


Figura 8.- Diagrama de Venn con miembros de la comunidad procarionte compartidos a nivel de género considerando la distancia con respecto a la pingüinera. Para la agrupación de muestras más cercanas a la pingüinera (PUNTA), se consideran las muestras de suelo: PUNTA-A, PUNTA-SU, PUNTA-PA, PUNTA-BS-SU y PUNTA-BS-PA. Mientras, la agrupación COLL incluyen las muestras más alejadas: COLL-BS1, COLL-BS2, COLL-BS3 y COLL-BS4.

Tabla 7.- Identificación de los miembros de la comunidad procarionte compartidos bajo una prevalencia del 80% a nivel de género entre el grupo de muestras cercanas (PUNTA) y lejanas (COLL) con respecto a la pingüinera.

Miembros Compartidos	
Phylum	Último Nivel Taxonómico
Acidobacteria	<i>Subgroup 7</i>
Verrucomicrobia	<i>Candidatus Udaeobacter</i>
Verrucomicrobia	<i>Chthoniobacter</i>
Gammaproteobacteria	<i>MND1</i>
Gammaproteobacteria	<i>Ellin6067</i>
Gammaproteobacteria	<i>Polaromonas</i>
Bacteroidia	<i>Ferruginibacter</i>
Bacteroidia	<i>Chitinophagaceae</i>
Acidobacteriia	<i>Bryobacter</i>

Este análisis se hizo a nivel de género, sin embargo, para los miembros correspondientes a organismos no cultivados, se les designó el último nivel taxonómico que presentan.

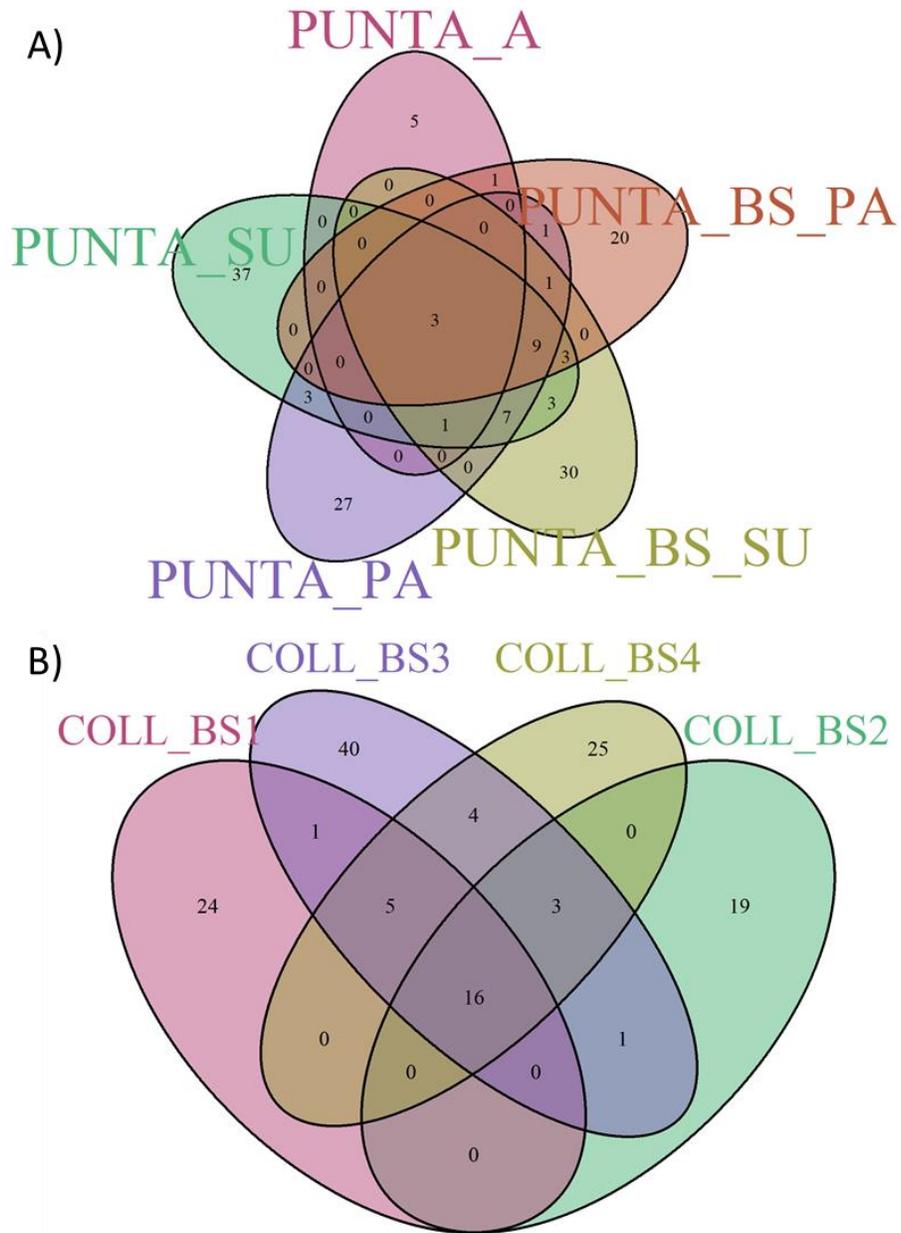


Figura 9.- Diagrama de Venn que refleja los miembros de la comunidad procarionte compartidos a nivel de género por sitio. En la figura 9A, se muestran los miembros compartidos entre los sitios PUNTA, mientras que en la figura 9B, se muestran los miembros compartidos entre los sitios COLL.

Tabla 8.- Identificación de los miembros de la comunidad procarionte compartidos bajo una prevalencia del 80% a nivel de género para las muestras PUNTA y COLL

A)

Miembros Compartidos	
Phylum	Último Nivel Taxonómico
Acidobacteria	Subgroup 7
Verrucomicrobia	<i>Candidatus Udaeobacter</i>
Verrucomicrobia	<i>Chthoniobacter</i>
Proteobacteria	MND1
Proteobacteria	Ellin6067
Proteobacteria	Rhizobiales Incertae Sedis
Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>
Bacteroidetes	OPB56
Actinobacteria	CL500-29 marine group
Actinobacteria	<i>Gaiella</i>
Bacteroidetes	Chitinophagaceae
Bacteroidetes	Saprospiraceae
Bacteroidetes	BSV26
Nitrospirae	<i>Nitrospira</i>
Planctomycetes	Gemmataceae
Planctomycetes	Pirellulaceae

B)

Miembros Compartidos	
Phylum	Último Nivel Taxonómico
Firmicutes	<i>Clostridium sensu stricto 13</i>
FBP	<i>uncultured bacterium</i>
Bacteroidetes	Chitinophagaceae

En la Tabla 8A, se detallan los miembros compartidos para las muestras PUNTA, mientras que en la Tabla 8B, se identifican los miembros compartidos para las muestras COLL. Este análisis se hizo a nivel de género, sin embargo, para los miembros correspondientes a organismos no cultivados, se les designó el último nivel taxonómico que presentan.

5.6.- Análisis de beta-diversidad sobre la comunidad procarionte en suelos antárticos

Para evaluar la diferencia entre la diversidad de especies presente en cada sitio, se realizaron análisis de beta-diversidad. En este caso se calculó el UniFrac ponderado (*weighted UniFrac*), utilizando las longitudes de las ramas las cuales son ponderadas basadas en la abundancia relativa de las taxa dentro de las comunidades. Como se observa en la **figura 10.A**, existen 3 grupos definidos que se diferencian entre sí, y que explican el 60,2% de la varianza total. Para evaluar si existen diferencias entre las muestras que son cercanas a la pingüinera (sitios PUNTA) o entre las muestras que son distantes a ésta (sitios COLL), se realizó el mismo análisis pero con un tratamiento de datos separados. Como se observa en la **figura 10.B**, el grupo PUNTA-A se continúa diferenciando del resto de muestras adyacentes a ella (56,2% de la varianza explicada). También se puede observar que la presencia de vegetación no es un factor determinante a la hora de establecer diferencias entre las comunidades de los sitios, ya que no existe una diferencia entre las comunidades de los sitios PUNTA-SU y PUNTA-PA con respecto a sus cercanos PUNTA-BS-SU y PUNTA-BS-PA, respectivamente. Mientras, para los sitios COLL (**Figura 10.C**), existe una mayor dispersión a la hora de establecer agrupaciones, donde el sitio COLL-BS2 tiene una distribución diferente con respecto al resto de los sitios (50,2% de la varianza explicada). También se evaluó mediante ANOVA permutacional (PERMANOVA) la significancia estadística de cada modelo de UniFrac ponderado (todos los sitios, sólo sitios PUNTA y sólo sitios COLL), reflejando para cada modelo desarrollado un p-value = 0,01. El análisis de PERMANOVA (**Tabla suplementaria S7**), se consideró como un soporte estadístico a los resultados descritos previamente (**Figura 10**) sobre la distribución de la comunidad microbiana en la distancia métrica desarrollada.

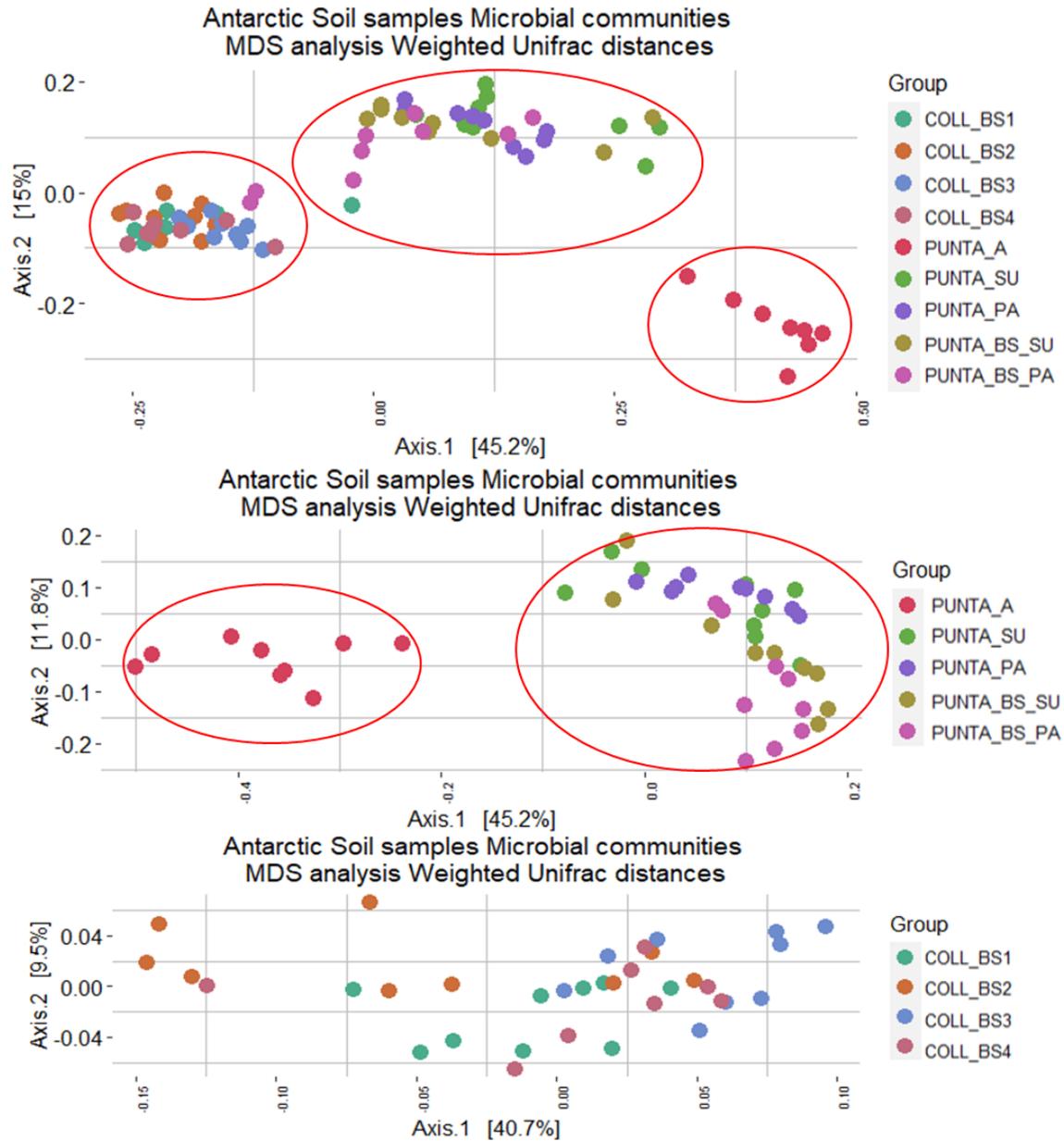


Figura 10.- Análisis de distancia basado en UniFrac ponderado entre las comunidades procariontes. A) Cuando se analizan todas las muestras, la varianza explicada por el eje 1 y 2 es 45,2% y 15%, respectivamente. El patrón de distribución muestra 3 agrupaciones diferentes para los sitios COLL, sitios PUNTA y el sitio PUNTA-A particularmente. B) Para el análisis de las muestras más cercana a la pingüinera (sitios PUNTA), el grupo PUNTA-A se diferencia del resto de muestras del sitio PUNTA, con una varianza explicada por el eje 1 y 2 del 45,2% y 11,8%, respectivamente. C) Para el análisis de las muestras más lejanas a la pingüinera (sitios COLL), no existe una clara distribución de los sitios, sin embargo, el sitio COLL-BS2, tiene una tendencia a diferenciarse con respecto a los otros grupos, con una varianza explicada por el eje 1 y 2 del 40,7% y 9,5%.

5.7.- Presencia de microorganismos del gremio diazotróficos a través de la identificación del gen *nifH* mediante PCR en muestras de DNA extraídas de suelo de Isla Decepción, Antártica

Para identificar la presencia de microorganismos diazotróficos en las muestras de suelo, se realizaron amplificaciones por PCR del gen *nifH*, utilizando diversos tipos de pareja de partidores (**Tabla 2**) tanto universales (pareja de partidores: PolF-PolR, Ueda19F-R6, IGK3-DVV), como específicos (pareja de partidores CNF-CNR).

En la **Figura 11**, se representa a modo de resumen los sitios en donde hubo amplificación para el gen *nifH*, y posterior visualización mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (**Figura suplementaria S5**). Utilizando partidores específicos para cianobacterias (partidores CNF-CNR), se identificó la presencia de este gen en las muestras que presentan una cobertura de musgo en la capa superior del suelo (PUNTA-SU y PUNTA-PA), en conjunto con la amplificación en la muestra de suelo desnudo del sitio PUNTA-BS-PA. Cuando se utilizaron los partidores universales PolF-PolR, se encontró la presencia de este gen en los sitios con vegetación (PUNTA-SU y PUNTA-PA) y en el sitio PUNTA-BS-SU. Mientras, al utilizar otra pareja de partidores universales, como son Ueda19F-R6, se identificó la presencia del gen *nifH* en el sitio ubicado en Collado Vapor (COLL-BS3), además de en los sitios PUNTA-PA y PUNTA-BS-SU. Finalmente, también se utilizó la pareja de partidores universales IGK3-DVV, identificando la presencia del gen *nifH* en las muestras provenientes de los sitios PUNTA-SU, PUNTA-PA y PUNTA-BS-PA.

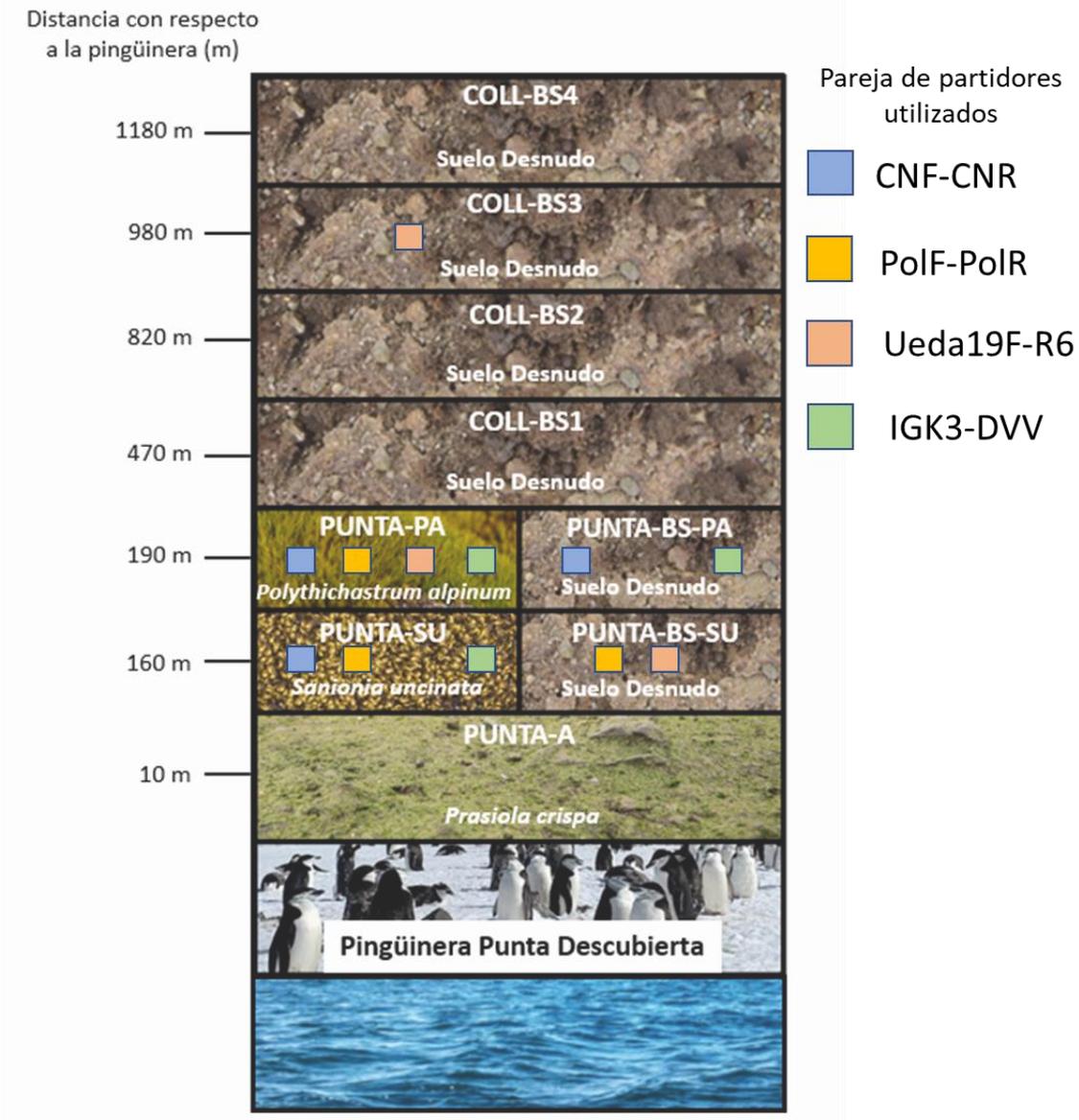


Figura 11.- Identificación de la presencia del gen *nifH* en muestras de suelo antártico. En cuadrados de colores se representan los puntos en donde hubo amplificación del gen *nifH* utilizando diversos partidores (ver imágenes de amplificación por PCR de genes *nifH* en **Figura suplementaria S5**).

5.8.- Identificación de secuencias del gen *nifH* en muestras de suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica

Basados en los datos reportados en la literatura (Gaby *et al.*,2012), y teniendo en consideración la cobertura que presentan los diversos tipos de parejas de partidores universales sobre diversas taxa, junto con la posibilidad de que ciertos partidores tales como IGK3-DVV sean capaces de generar secuencias homólogas al gen *nifH* (Angel *et al.*, 2018), es que se evaluaron también los amplicones generados por esta pareja de partidores en las muestras de este estudio. Mediante clonamiento, se enviaron a secuenciar 13 plásmidos que incorporaron productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación del gen *nifH* utilizando la pareja de partidores IGK3-DVV, resultando en 3 secuencias con la calidad suficiente para identificarlas (datos no mostrados). Cuando estas secuencias fueron traducidas y posteriormente enfrentadas al modelo oculto de Markov descrito para la dinitrogenasa reductasa y sus otras proteínas homólogas (pipeline NifMAP), resultó que solo una secuencia efectivamente correspondía al modelo descrito para dinitrogenasa reductasa (**Figura suplementaria S6**). Bajo este resultado preliminar y teniendo en consideración experiencias previas en el laboratorio utilizando los partidores PolF-PolR y los análisis descritos en Angel *et al.*,2018, es que se decidió secuenciar masivamente los amplicones provenientes del sitio PUNTA-PA utilizando las parejas de partidores PolF-PolR y Ueda19F-R6.

Las secuencias obtenidas posteriormente fueron analizadas mediante el pipeline NifMAP, de manera similar a lo ya previamente descrito (Angel, *et al.*, 2018). De esta manera, se obtuvieron los ASVs correspondientes para cada pareja de partidores que son anotados como una secuencia efectiva para el modelo oculto de Markov descrito para la dinitrogenasa. Luego, estas secuencias fueron traducidas y posteriormente los análisis que siguen se trabajaron a nivel de proteína. Mediante Blastp, se obtuvieron las secuencias más

próximas (en porcentaje de identidad), a los ASVs obtenidos (**Tabla suplementaria S2**). Luego se realizó un posicionamiento filogenético de secuencias cortas, utilizando epa-ng, tanto de los ASVs como de los mejores *hits* obtenidos por Blastp contra una reconstrucción filogenética de referencia (usando secuencias sobre 280 aminoácidos de largo) previamente realizada utilizando iQtree (modelo del árbol de referencia LG+I+G4, Bootstraps 10.000). En la **Figura 12** se muestra el resultado de este posicionamiento filogenético, identificando los clados en donde se realizó el posicionamiento de estas secuencias. De esta manera, los ASVs obtenidos mediante los partidores PolF-PolR, se posicionan sobre clados definidos para Nostocales, Burkholderiales y Clostridiales. Mientras que, para los ASVs obtenidos utilizando la pareja de partidores Ueda19F-R6, se posicionan sobre clados definidos para Frankiales y Clostridiales. Para cada posicionamiento, se establecieron valores de la probabilidad de la razón de peso (Likelihood weight ratio) de cada secuencia (ASVs de estudio y mejores *hits* por Blastp, **Tabla suplementaria S8**).

Finalmente, a partir de la tabla de cuentas de los ASVs anotados como *nifH*, y tomando en consideración el posicionamiento filogenético que presentan estas secuencias, se hicieron análisis de abundancia relativa (**Figura 13**). Con los partidores PolF-PolR un 78,44% de las lecturas corresponden a Nostocales, 12,60% a Burkholderiales y 0,08% a Clostridiales. Mientras que utilizando los partidores Ueda19F-R6, un 86,34% de las lecturas corresponden a Frankiales, 0,06% a Clostridiales y 0,07% fueron secuencias no asignadas. Este último corresponde al ASV 52892-UedaPrimers (PUNTA-PA) el cual no está posicionado sobre un clado con taxonomía definida.

Figura 12.- Reconstrucción y posicionamiento filogenético de las secuencias *nifH* obtenidas con los partidores Ueda19F-R6 y PolF-PolR (Figura página previa). La reconstrucción filogenética se construyó a partir de 190 secuencias largas (280 aminoácidos de corte mínimo) asignadas como *nifH*, lo cual se hizo por medio de iQtree, con un soporte de Bootstrap de 10000. En el árbol se representan los valores de Bootstrap para los clados principales en número, mientras que para el resto de los clados, el nivel de Bootstrap se muestra como un punto negro en la rama en el caso que tenga un valor mayor al 50%. El número de secuencias obtenidas mediante la secuenciación masiva utilizando los partidores PolF-PolR y Ueda19F-R6, además de los mejores *hits* identificados por Blastp, se encuentran posicionadas en los clados y marcadas en cuadros amarillos (PolF-PolR), y en cuadros celeste (Ueda19F-R6).

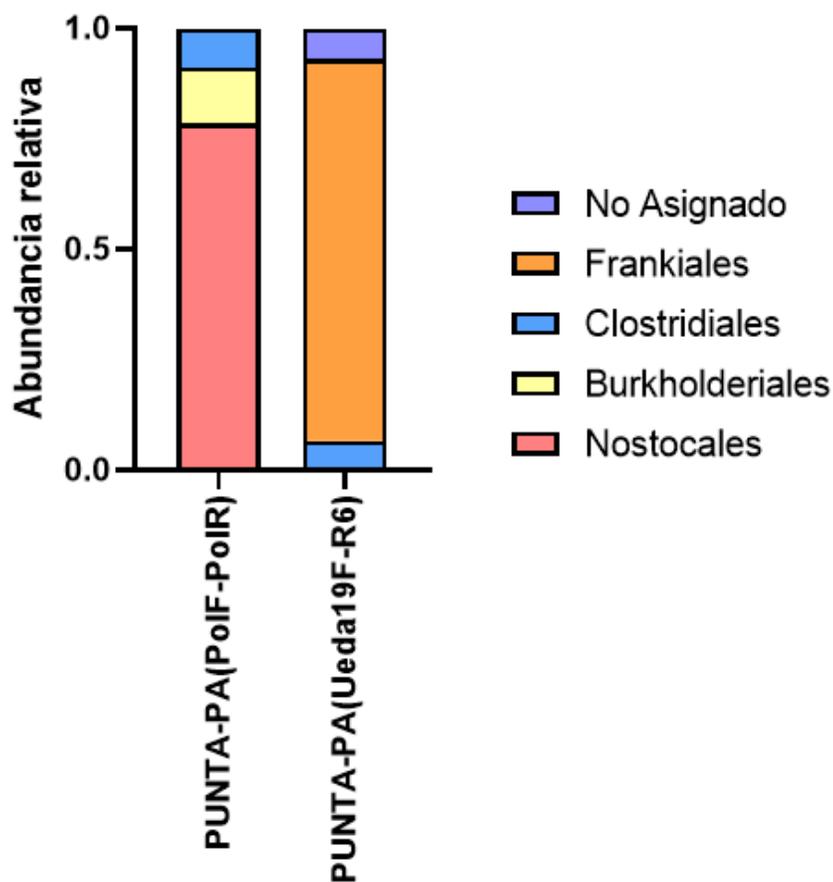


Figura 13.- Abundancia relativa de los ASVs obtenidos mediante con los partidores PoIF-PoIR y Ueda19F-R6 en la muestra PUNTA-PA. A partir de la aproximación filogenética determinada a partir del posicionamiento de las secuencias contra la reconstrucción filogenética de referencia, se les asignaron a los ASV su taxonomía en función de esta aproximación. Con los partidores PoIF-PoIR un 78,44% de las lecturas corresponden a Nostocales, 12,6% a Burkholderiales y 0,08% a Clostridiales. Mientras que utilizando los partidores Ueda19F-R6, un 86,34% de las lecturas corresponden a Frankiales, 0,06% a Clostridiales y 0,07% no asignado. Este último corresponde al ASV 52892-UedaPrimers (PUNTA-PA) el cual no está posicionado sobre un clado con taxonomía definida.

5.9.-Identificación de genes relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno mediante aproximación bioinformática a partir de secuencias del gen 16S rRNA

Para obtener más información sobre posibles fijadores de nitrógeno presentes en las muestras de suelo antártico, se desarrollaron análisis diferenciales para la predicción de funciones metagenómicas utilizando el software PICRUSt2 a partir de las secuencias obtenidas de la secuenciación del gen 16S rRNA. En particular se analizaron los genes relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno (*nifH*, *nifD* y *nifK*, **Figura 14**), observándose un mayor número de copias (cercano a 700 copias) para estos genes en la muestra PUNTA-PA, comparado con los sitios PUNTA-SU, PUNTA-BS-SU y PUNTA-BS-PA (aproximadamente 400 copias de estos genes). Contrariamente, las muestras de los sitios COLL y el sitio PUNTA-A presentan un bajo número de copias de estos genes (menos de 150 copias). Por otro lado, y tomando en consideración la abundancia relativa de las taxa, se identificaron a nivel de orden los microorganismos más abundantes que presentan los genes analizados (**Tabla 9**). Enfocándonos de nuevo en el proceso de fijación de nitrógeno, se identificó que para las muestras del sitio PUNTA-PA, el 1,37% (en términos de abundancia relativa) de la comunidad corresponde a Clostridiales que presentan los genes *nifH*, *nifK* y *nifD*. Específicamente para este sitio PUNTA-PA le siguieron, Rhizobiales (0,74 %), Selenomonadales (0,38 %), Betaproteobacteriales (0,09%) y Frankiales (0,01%). Al observar la abundancia relativa de las taxa que presentan estos genes, también se identificó que el sitio más cercano a la pingüinera PUNTA-A, presenta los menores niveles de organismos fijadores de nitrógeno. Por otro lado, y de la misma manera, se identificó la presencia de Methylococcales (0,85 %) en uno de los sitios más distante de la pingüinera (COLL-BS2).

Por otro lado, también se evaluaron genes relacionados con otros procesos relacionados con el metabolismo del nitrógeno (desnitrificación, oxidación de amonio y reducción del nitrato en forma asimilatoria y disimilatoria) y que están representados en la **Figura suplementaria S7** y la **Tabla suplementaria S9**.

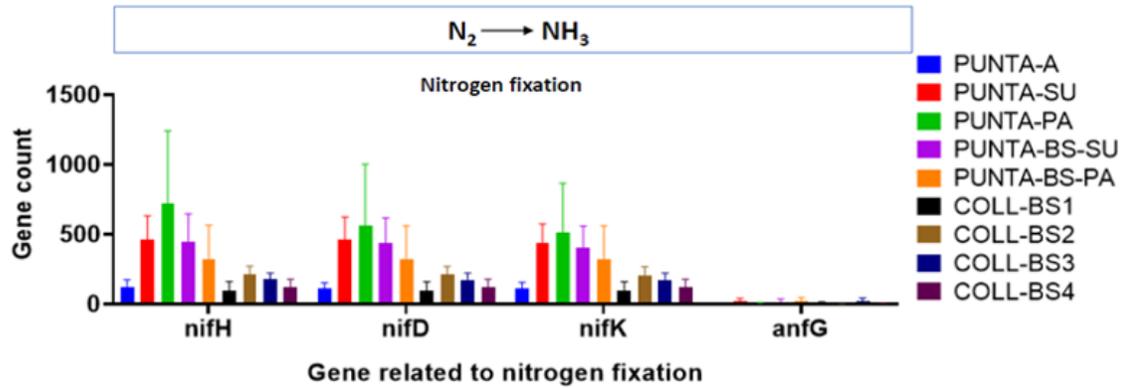
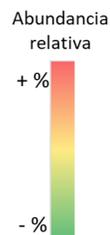


Figura 14.- Abundancia de genes relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno a través de predicciones metagenómicas por medio de PICRUSt2. Estimación específica de genes relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno. Se determinaron los genes del metabolismo del nitrógeno bajo la búsqueda en la base de datos del KO (Ver **Tabla 5**).

Tabla 9.- Identidad y abundancia de microorganismos que presentan genes relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno a través de predicciones metagenómicas por medio de PICRUST2

Process	Gene	Taxonomic rank: Order	PUNTA-A	PUNTA-SU	PUNTA-PA	PUNTA-BS-SU	PUNTA-BS-PA	COLL-BS1	COLL-BS2	COLL-BS3	COLL-BS4
Nitrogen Fixation	<i>nifH</i>	Selenomonadales	0.00%	0.11%	0.38%	0.15%	0.00%	0.00%	0.03%	0.09%	0.00%
		Clostridiales	0.06%	0.47%	1.37%	0.40%	0.04%	0.01%	0.15%	0.34%	0.10%
		Methylococcales	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.58%	0.15%	0.85%	0.20%	0.08%
		Rhizobiales	0.07%	0.40%	0.74%	0.37%	0.43%	0.06%	0.05%	0.21%	0.14%
	<i>nifK</i>	Frankiales	0.00%	0.03%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
		Betaproteobacteriales	0.13%	0.04%	0.09%	0.03%	0.06%	0.15%	0.13%	0.18%	0.14%
		Selenomonadales	0.00%	0.11%	0.38%	0.15%	0.00%	0.00%	0.03%	0.09%	0.00%
		Clostridiales	0.02%	0.46%	1.37%	0.39%	0.03%	0.00%	0.15%	0.32%	0.10%
	<i>nifD</i>	Methylococcales	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.58%	0.15%	0.85%	0.20%	0.08%
		Rhizobiales	0.07%	0.40%	0.74%	0.37%	0.43%	0.06%	0.05%	0.21%	0.14%
		Betaproteobacteriales	0.13%	0.04%	0.09%	0.03%	0.06%	0.15%	0.13%	0.18%	0.14%
		Selenomonadales	0.00%	0.11%	0.38%	0.15%	0.00%	0.00%	0.03%	0.09%	0.00%
<i>anfG</i>	Clostridiales	0.02%	0.46%	1.37%	0.39%	0.03%	0.00%	0.15%	0.32%	0.10%	
	Methylococcales	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.58%	0.15%	0.85%	0.17%	0.08%	
		Rhizobiales	0.07%	0.40%	0.74%	0.37%	0.43%	0.06%	0.05%	0.21%	0.14%
		Betaproteobacteriales	0.13%	0.04%	0.09%	0.03%	0.06%	0.15%	0.13%	0.18%	0.14%
		Rhizobiales	0.00%	0.08%	0.03%	0.08%	0.13%	0.03%	0.00%	0.13%	0.02%



5.10.- Efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la comunidad procarionte en muestras de suelo antártico.

Para poder hacer un estudio de la posible correlación entre la composición de la comunidad y los factores ambientales, es que se determinaron diversos parámetros fisicoquímicos en los mismos suelos donde se tomaron las muestras de suelo correspondientes a las réplicas biológicas 1 de cada sitio, teniendo en consideración que las muestras correspondientes al sitio PUNTA-BS-SU y PUNTA-BS-PA fueron mezcladas, por lo que para los siguientes datos se trabajará con los mismos metadatos (PUNTA-SU-PA-BS, **Tabla 10**). Se normalizaron los valores para cada parámetro fisicoquímico en función de una distancia Euclidiana (**Figura 15**). Basados en estos resultados, el sitio PUNTA-A, presenta una alta abundancia en especies combinadas de nitrógeno, tanto a nivel de nitrógeno disuelto (DN, 27,55 $\mu\text{g/g soil DW}$), como también a nivel de NO_3^- (2,52 $\mu\text{g NO}_3\text{-N /gDW}$) y NH_4^+ (24,04 $\mu\text{g NH}_4\text{-N /gDW}$). Esto se hace más evidente, cuando lo comparamos con los sitios más distantes (sitios COLL) con respecto a la pingüinera, por ejemplo, con el sitio COLL-BS2 que presenta los mayores nivel de nitrógeno (DN: 5,30 $\mu\text{g/g soil DW}$, NO_3^- : 0,07 $\mu\text{g NO}_3\text{-N /gDW}$, NH_4^+ : 5,75 $\mu\text{g NH}_4\text{-N /gDW}$). Por otro lado, cuando observamos el N microbiano, éste se encuentra en mayor abundancia en los sitios con presencia de vegetación (PUNTA-SU: 81,99 $\mu\text{g/g soil DW}$, PUNTA-PA: 51,13 $\mu\text{g/g soil DW}$), en comparación con el resto de sitios de suelo desnudo. Así mismo, cuando observamos las especies derivadas de fósforo, tales como fosfato (Pi) y fosfato disuelto total (TDP), se observa que el sitio PUNTA-A, presenta altas concentraciones de estas especies (220,31 $\mu\text{g/P soil DW}$ y 211,67 $\mu\text{g/P soil DW}$, respectivamente). En especial, se encontraron diferencias cuando comparamos PUNTA-A con los datos obtenidos para los sitios COLL, en donde, en promedio los valores de especies combinadas de fósforo, son aproximadamente 30 veces menor. De esta forma, estos resultados muestran que la presencia de la pingüinera notablemente afecta la geoquímica del suelo en los sitios cercanos a ésta, en especial el sitio PUNTA-A, comparados con los sitios más distantes ubicados en Collado Vapor.

En vista a que sólo hay datos para el análisis de las variables fisicoquímicas de algunos sitios y réplicas, es que se evaluó la similitud entre muestras a nivel de 16S rRNA, para de esta manera poder determinar si es realmente posible utilizar los mismos metadatos para todas las réplicas de un mismo sitio, realizando un análisis de disimilitud de Jaccard (**Figura suplementaria S8**). Este análisis mostró un alto grado de disimilitud entre réplicas de cada sitio, especialmente en las muestras provenientes de Collado Vapor. Por lo tanto, se decidió trabajar únicamente con los metadatos pertenecientes a las variables fisicoquímicas que corresponden a las réplicas biológicas 1 de cada muestra/sitio (los resultados que vienen a continuación consideran los datos de abundancia de especies exclusivos para las réplicas biológicas 1). Para evaluar el efecto que tienen las variables ambientales sobre la comunidad procarionte, se realizó un análisis de correspondencia desviado (DCA, por sus siglas en inglés) para poder definir el tipo de modelo de ordenación restringida a usar. Se obtuvo una longitud del eje del DCA1 de 7,0812, lo cual sugiere utilizar un modelo unimodal (CCA: Análisis de correspondencia canónica). Se evaluó la significancia estadística del modelo mediante ANOVA, obteniendo un p-value = 0,001. Luego se determinó la significancia estadística para cada variable ambiental mediante ANOVA, obteniéndose que las variables que impactan la comunidad procarionte (**Tabla suplementaria S10**) corresponden a TDP (p-value= 0,001), NO₃ (p-value= 0,001), P (p-value=0,01), TP (p-value= 0,08) y NH₄⁺ (p-value= 0,05). En la **Figura 16** está representado el CCA, en el cual ambos ejes explican el 70,14% de la varianza. Se observa que la comunidad procarionte del sitio PUNTA-A se está viendo influenciado por la presencia de NH₄⁺, NO₃⁻ y TDP. Mientras, el resto de las muestras de los sitios PUNTA, se están viendo influenciados por la presencia de TP y P.

Finalmente, se realizó un análisis de co-ocurrencia para identificar las correlaciones de los ASVs más abundantes, considerando también la presencia de variables ambientales. Para ello, se filtraron los ASVs con una abundancia relativa mayor al 0,5% (413 ASVs) y junto con los parámetros fisicoquímicos, se determinó sus correlaciones mediante Spearman.

Utilizando un rho de Spearman de $+0,6 \leq r \leq -0,6$ y $p\text{-value} < 0,01$, se obtuvieron 7650 correlaciones positivas y 2787 correlaciones negativas. Estos resultados fueron gráficos mediante análisis de redes usando Cytoscape (cytoscape.org) (**Figura 17**). En este análisis se observa la presencia de 3 grandes agrupaciones, en donde un grupo totalmente diferenciado corresponde a los ASVs provenientes del sitio PUNTA-A, presentando además una correlación positiva (línea gris) con el resto de muestras de los otros sitios PUNTA. Por otro lado, los grupos de ASVs proveniente de los sitios COLL, presentan una alta correlación positiva entre sí, pero una correlación negativa (línea azul) con los ASVs provenientes del grupo de muestras de los sitios PUNTA. De igual manera, los ASVs de los sitios COLL, presentan un alto número de correlaciones negativas con las variables fisicoquímicas que cumplen con los estándares de filtro según rho de Spearman. Por otro lado, los ASVs del sitio PUNTA-A, presentan fuertes correlaciones (visualizadas por la distancia de la interacción) con NH_4^+ y NO_3^- , reflejando lo observado en el CCA.

Tabla 10.- Parámetros fisicoquímicos para las muestras de suelo antártico (réplica biológica1)

Muestra	d15N/14N (‰ Air)	d13C/12C (‰ V-PDB)	Al (g/kg)	Ca (g/kg)	Fe (g/kg)	K (g/kg)	Mg (g/kg)	Mn (g/kg)	Na (g/kg)	P (g/kg)	Si (g/kg)	Ti (g/kg)	Zr (g/kg)
PUNTA-A	14,70	-24,58	13,43	7,77	25,20	0,92	9,55	0,30	0,63	1,65	0,08	1,73	0,00
PUNTA-SU	8,21	-24,59	12,87	8,32	22,04	0,77	8,51	0,29	0,66	1,54	0,08	1,57	0,00
PUNTA-PA	8,17	-24,48	12,42	8,09	21,53	0,70	8,19	0,26	0,66	1,60	0,07	1,39	0,00
PUNTA-SU-PA-BS	12,62	-25,84	11,72	8,00	21,16	0,89	6,92	0,24	0,63	2,91	0,06	1,43	0,00
COLL-BS1	3,85	-26,68	13,39	8,76	24,01	0,94	9,87	0,35	0,72	0,31	0,07	1,72	0,02
COLL-BS2	2,83	-27,73	12,60	8,50	22,25	0,86	10,15	0,33	0,69	0,25	0,08	1,57	0,02
COLL-BS3	NA	-28,13	13,81	8,94	28,02	1,03	10,71	0,37	0,76	0,33	0,11	2,21	0,03
COLL-BS4	6,64	-27,39	13,65	9,15	23,12	0,89	10,26	0,34	0,76	0,28	0,10	1,64	0,02

Muestra	TP (µg/g DW)	TIP (µg/g DW)	DOC (KCl) (µg/g soil DW)	DN (KCl) (µg/g soil DW)	NH4 (µg NH4-N /gDW)	(NO3 (µg NO3-N /gDW)	Pi (µg P / gDW)	TDP (µg P / gDW)	Cmic (µg/g soil DW)	Nmic (µg/g soil DW)
PUNTA-A	1616,364	1604,130	56,05	27,55	24,04	2,52	220,31	211,67	168,72	48,91
PUNTA-SU	227,460	193,241	111,71	22,97	7,21	0,66	72,69	129,84	586,14	81,99
PUNTA-PA	1672,228	1694,739	126,70	11,34	3,18	0,01	77,14	103,22	586,17	53,13
PUNTA-SU-PA-BS	3386,957	2812,590	29,13	7,53	4,09	0,38	143,31	142,73	334,54	45,24
COLL-BS1	296,242	300,225	0,26	0,83	1,28	0,05	7,73	4,82	76,60	10,38
COLL-BS2	203,380	221,023	8,49	5,30	5,75	0,07	4,72	4,64	57,74	16,22
COLL-BS3	336,111	344,372	25,33	5,40	3,89	0,05	6,00	6,89	23,62	7,99
COLL-BS4	241,177	290,129	0,10	0,38	0,90	0,04	5,65	5,00	55,42	9,44

Muestra	Sand [%] (WRB)	Silt [%] (WRB)	Clay [%] (WRB)	WHC [gH2O / gDW]	pH _{H2O} [1:5 w:v]	pH _{CaCl2} [1:5 w:v]	Total C (%)	Total N (%)
PUNTA-A	81,8	15,9	2,3	0,28	5,6	4,0	0,38	0,05
PUNTA-SU	84,5	13,8	1,7	0,41	6,1	4,5	0,76	0,07
PUNTA-PA	80,2	17,4	2,4	0,40	6,3	4,8	0,68	0,06
PUNTA-SU-PA-BS	76,4	20,4	3,2	0,28	6,3	4,8	0,48	0,06
COLL-BS1	85,4	12,4	2,2	0,25	6,8	5,6	0,34	0,03
COLL-BS2	85	12,8	2,2	0,25	6,8	5,8	0,17	0,03
COLL-BS3	92,5	6	1,5	0,31	6,5	6,0	0,21	0,03
COLL-BS4	88,9	9	2,1	0,28	6,5	6,1	0,29	0,03

Abreviaciones: TP= fósforo total, TIP= fósforo inorgánico total, WHC= capacidad de retención de agua, DOC= carbono orgánico disuelto, Cmic= carbono microbiano, Nmic= nitrógeno microbiano, TDP= fosfato total (fosfato orgánico + fosfato inorgánico), DN= nitrógeno disuelto.

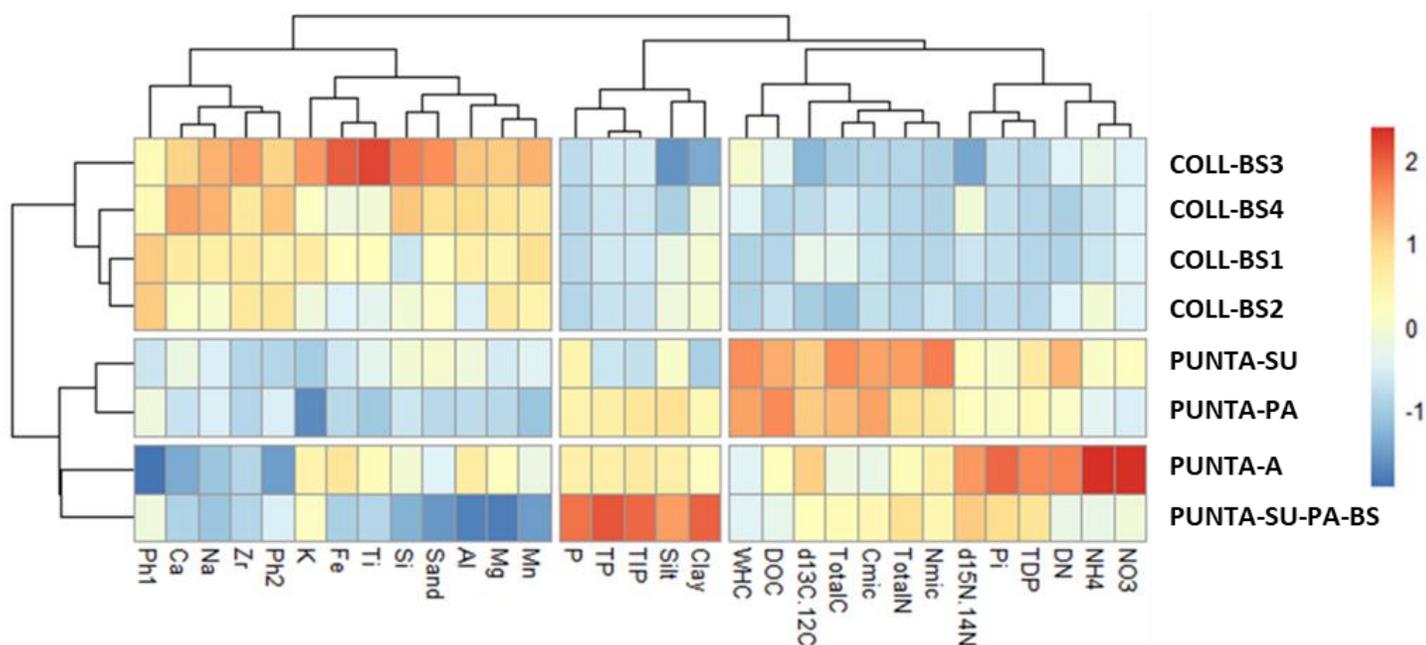


Figura 15.- Parámetros fisicoquímicos normalizados para las muestras de suelo antártico. Se normalizaron los valores calculados para cada parámetro fisicoquímico en función de una distancia Euclidiana. El sitio más cercano a la pingüinera (PUNTA-A) presenta una mayor abundancia de formas distintas de nitrógeno disponible. Mientras, las zonas con vegetación (PUNTA-SU y PUNTA-PA) presentan una mayor cantidad de carbono total, junto con un mayor contenido de agua. Por otro lado, los sitios COLL presentan una mayor cantidad de metales. Abreviatura: TP= fósforo total, TIP= fósforo inorgánico total, WHC= capacidad de retención de agua, DOC= carbono orgánico disuelto, Cmic= carbono microbiano, Nmic= nitrógeno microbiano, TDP= fosfato total (fosfato orgánico + fosfato inorgánico), DN= nitrógeno disuelto, ph1= pH medido en agua, ph2= pH medido en cloruro de calcio.

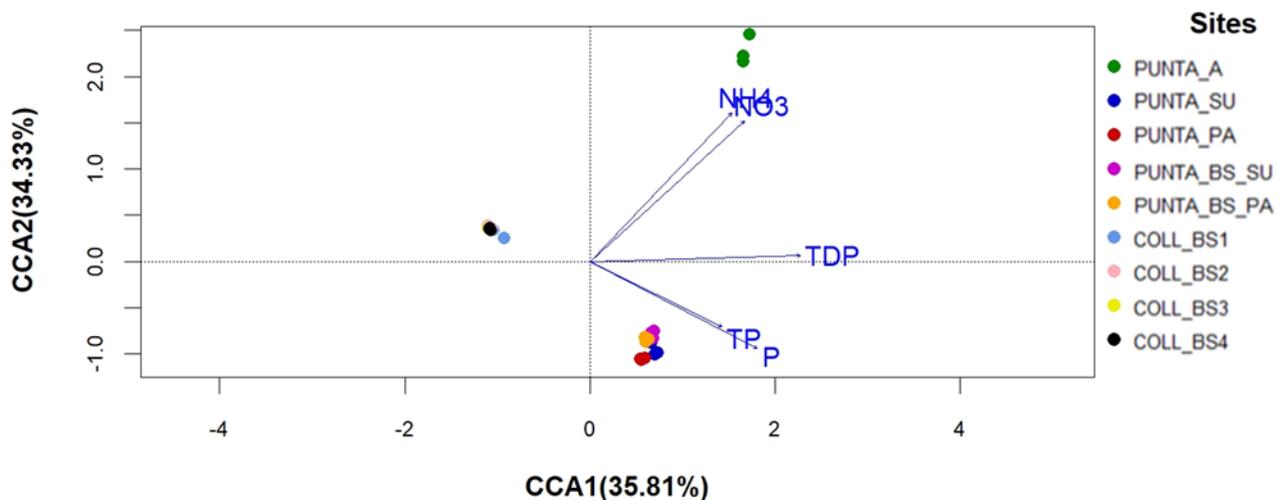


Figura 16.- Análisis de correspondencia canónica (CCA) de la comunidad procarionte con las variables mediambientales. Los ejes CCA1 y CCA2 explican el 35,81% y 34,33% de la varianza, respectivamente. Se observan tres grupos diferenciados, en donde la comunidad del sitio PUNTA-A se está viendo influenciado por la presencia de NH₄⁺, NO₃⁻ y TDP. Mientras que los miembros de la comunidad correspondiente a los sitios PUNTA-SU, PUNTA-PA, PUNTA-BS-SU y PUNTA-BS-PA, se ven influenciados por la presencia de elementos derivados de fósforo, tales como TP y P.

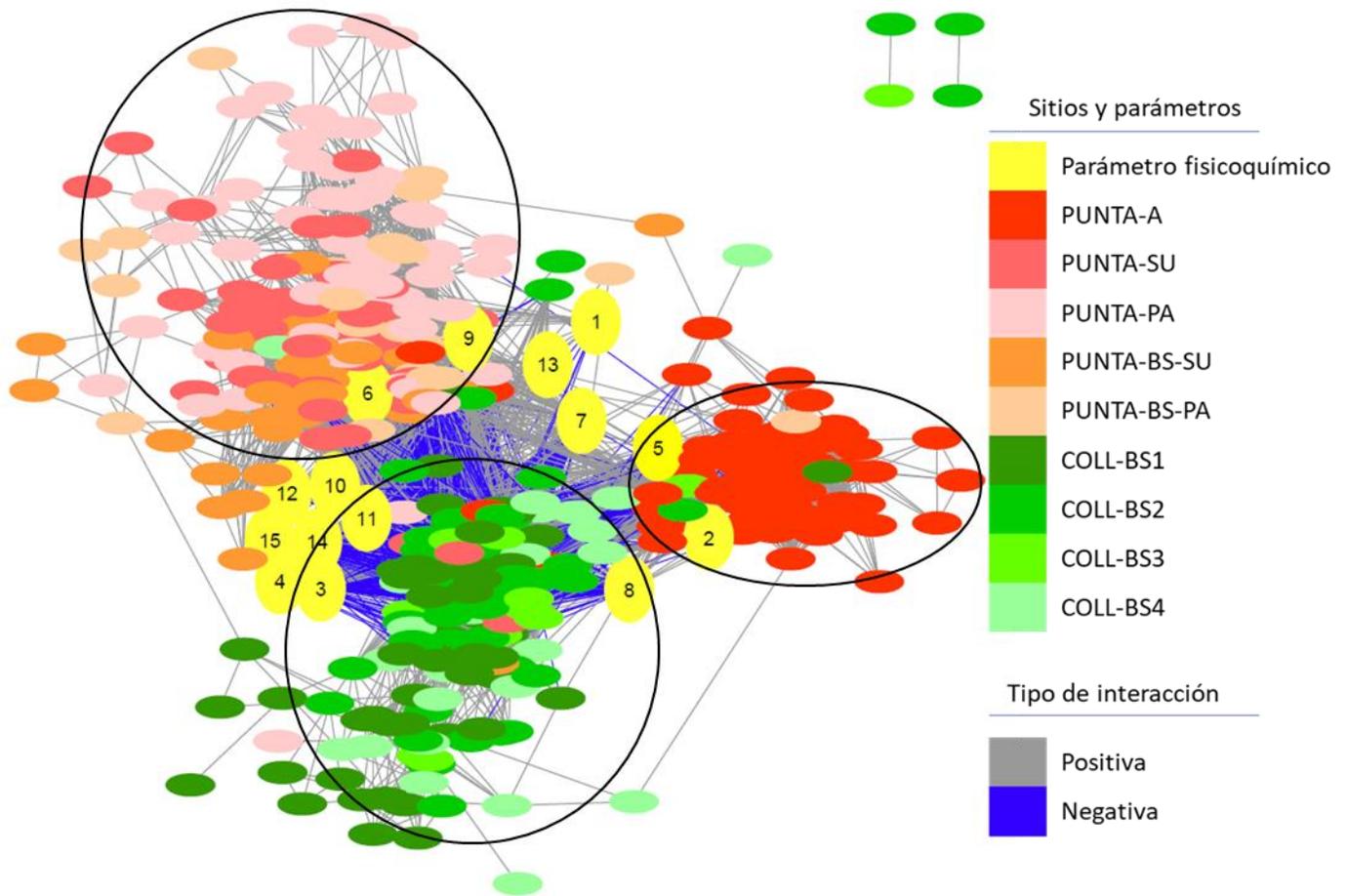


Figura 17.- Análisis de redes basados en correlación de Spearman sobre ASVs con abundancia relativa sobre el 0,5% y variables medioambientales. Se obtuvieron 413 ASVs con una abundancia relativa superior al 0,5%, y utilizando el rango del coeficiente de Spearman $+0,6 \leq r \leq -0,6$ con un p -value $< 0,01$, se lograron 7650 correlaciones positivas (línea gris) y 2787 correlaciones negativas (línea azul). Las variables fisicoquímicas que presentan correlaciones bajo el índice de Spearman nombrado previamente están representadas por círculos amarillos, numerados, en donde: 1: WHC, 2: NO_3 , 3: Pi, 4: TDP, 5: NH_4 , 6: Cmic, 7: Nmic, 8: $\text{d}^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, 9: $\text{d}^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, 10: TotalC, 11: TotalN, 12: TP, 13: TIP, 14: DOC y 15: TP.

6.-Discusión

6.1.- Efecto de la pingüinera sobre la geoquímica del suelo

Los pingüinos se consideran biotransportadores de nutrientes, ya que permiten transferir diversos compuestos desde el mar a la tierra, y de esta manera, mejorar la disponibilidad de nutrientes en los suelos (Santamans *et al.*, 2017). El principal aporte de estas aves es a nivel de ingreso de nitrógeno a estos ecosistemas (Tatur 2002). Estudios sobre la contribución de nutrientes nitrogenados por parte de los pingüinos muestran incluso valores de 6000 $\mu\text{g/g}$ de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y 90 $\mu\text{g/g}$ de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ en suelos ornitogénicos (Spider *et al.*, 1984, Vishniac *et al.*, 1993). Nuestros resultados en suelo cercano a la pingüinera Punta Descubierta de Isla Decepción en Antártica, muestran que hay un cambio considerable en la geoquímica respecto al resto de los suelos de Isla Decepción. Para PUNTA-A, el sitio más cercano a esta pingüinera, los nutrientes nitrogenados alcanzan los valores de 24,04 $\mu\text{g/g}$ de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y 2,52 $\mu\text{g/g}$ de $\text{NO}_3^-\text{-N}$, mientras que para el sitio más distante COLL-BS4 (a casi 1200m desde la pingüinera), los nutrientes nitrogenados alcanzan tan solo valores de 0,90 $\mu\text{g/g}$ de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y 0,04 $\mu\text{g/g}$ de $\text{NO}_3^-\text{-N}$. La alta transferencia de compuestos derivados del nitrógeno y también fósforo a estos suelos de pingüinera, coincide con lo ya determinado en diversos estudios (Tatur, 2002), lo cual constituye una característica propia de los suelos ornitogénicos. Este tipo de suelos, en general provienen de la hidrólisis del ácido úrico, constituyente del guano, mediante degradación por actividad microbológica (Hutchinson 1950). Por otro lado, hay estudios que reportan que los pingüinos también se podrían considerar transportadores de metales, principalmente asociados con contaminación antropogénica, dada la influencia humana a través del tránsito de barcos y otras actividades locales o globales (Santamans *et al.*, 2017). Esto último, difiere de lo encontrado en nuestros resultados, donde los suelos con un mayor contenido de metales son aquellos más distantes a la pingüinera, situados en la zona de Collado (COLL) (Figura 15, Tabla 11). Sin embargo, este fenómeno se puede explicar por el nivel de pH y contenido de materia orgánica presentes en los suelos más cercanos a la pingüinera (Parfitt *et al.*, 2009), y debido a que en suelos volcánicos como los de Isla

Decepción, los elementos como el aluminio son abundantes, pudiendo formar complejos estables de materia orgánica-metal, disminuyendo así su disponibilidad y afectando su medición (McDaniel *et al.*, 2012).

6.2.- Efecto de la pingüinera sobre la microbiota

Por medio de esta tesis se logra expandir el conocimiento de trabajos recientes que sugieren un efecto de las pingüineras sobre el microbioma de suelos de Antártica (Guo *et al.*, 2018, Ramírez-Fernández *et al.*, 2019, Santamans *et al.*, 2017, Texeira *et al.*, 2013). Nuestros resultados reflejan el efecto que tiene la transferencia de nutrientes aportados por los pingüinos a lo largo de un transecto de estudio de más de 1200 m desde la posición actual de la colonia. Al evaluar la abundancia relativa a nivel de *phylum* (de los 20 *phyla* más abundantes), se observa que Proteobacterias, Bacteroidetes y Acidobacterias se mantienen como los *phyla* dominantes a lo largo de todo el transecto. Estos resultados son similares a lo reportado previamente (Guo *et al.*, 2018), especialmente en el aumento de Bacteroidetes (35%) en sitios potencialmente más influenciados por los pingüinos (ej. sitio PUNTA-A). Recientemente, Barbosa *et al.*, 2016 evaluaron la microbiota presente en el tracto gastrointestinal de pingüinos barbijos en la pingüinera Punta Descubierta de Isla Decepción, mediante pirosecuenciación. Sus estudios reflejan que las taxa dominantes en este órgano pertenecen al *phylum* Firmicutes (58% de las lecturas), principalmente Clostridia, y a Bacteroidetes (16,6% de las lecturas), especialmente de la clase Bacilli. De esta manera, se sugiere que la alta abundancia de Bacteroidetes presente en suelos del sitio más cercano a la pingüinera, sería transferido directamente por el guano del pingüino, de manera similar a lo que reporta Guo *et al.*, 2018. Si estas bacterias permanecen activas y con alguna función relevante en estos suelos, es algo que está todavía por esclarecer a través por ejemplo de estudios de metatranscriptómica. Por otro lado, contrario a los suelos cercanos a la pingüinera y por tanto bajo su efecto directo, en suelos más alejados encontramos mayor abundancia de otros *phyla* como por ejemplo Gemmatimonadetes. Este *phylum* fue particularmente abundante en suelos distantes de la pingüinera Punta Descubierta, y ya ha

sido descrito previamente como abundante en otros suelos antárticos con una baja concentración de nutrientes (Niederberger *et al.*, 2008). Estas abundancias son muy similares a lo también reportado por Chua y colaboradores en 2018 para suelos antárticos provenientes de Isla Decepción y que se encuentran alejados de esta pingüinera.

A niveles taxonómicos más bajos, en este trabajo se identificó que miembros del género *Rhodanobacter* son altamente abundantes en el sitio más cercano a la pingüinera, aproximadamente 17 veces más abundante que en el resto de los sitios aún cercanos a la pingüinera, y 34 veces más abundantes que en los sitios ya más alejados localizados en la zona de Collado Vapor (COLL). Este aumento ha sido reportado en otros estudios relacionados con influencia de los pingüinos sobre la microbiota terrestre (Aislabie *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2015, Guo *et al.*, 2018, Ramírez-Fernández *et al.*, 2019), y estaría relacionado con su función metabólica como microorganismos desnitrificantes en estos suelos. Los miembros de este género presentan un metabolismo anaerobio facultativo, donde en ausencia de oxígeno, crecen usando nitrato, nitrito y óxido nitroso como aceptor de electrones, y de esta forma exhibir una completa desnitrificación (Prakash *et al.*, 2012). Al ser los suelos ornitogénicos ricos en estos nutrientes, permiten que estos microorganismos sean altamente exitosos en suelos bajo la influencia de la pingüinera. Por otra parte, esto se apoya también en el análisis de ocurrencia realizado en este estudio (Figura 7), donde en los sitios más distantes a la pingüinera con menor contenido en estos nutrientes, la presencia de este género es mucho menor o simplemente nula (0% de abundancia relativa en los sitios COLL). Por otro lado, la familia Chitinophagaceae presenta una alta abundancia en todos los sitios de muestreo que se investigaron en esta tesis. Esta familia ha sido reportada previamente en suelos antárticos (Perschina *et al.*, 2018, Denis *et al.*, 2019), y descritos como uno de los principales gestores en la degradación de quitina y otros compuestos orgánicos del suelo (Chung *et al.*, 2012). En este sentido, el guano del pingüino es muy rico en quitina, proveniente del exosqueleto del krill (*Euphausia superba*), el cual es parte esencial de la dieta del pingüino barbijo que domina la colonia de Punta Descubierta en Isla Decepción (Caut *et al.*, 2012). Además, se ha reportado que la presencia

de esta familia bacteriana es más frecuente en hábitats antárticos marítimos cálidos (Chung *et al.*, 2012), lo cual es una característica del suelo de Isla Decepción.

Estas diferencias encontradas a niveles taxonómicos más bajos se hacen más evidentes cuando observamos la ocurrencia de miembros según los sitios. Los sitios PUNTA (ceranos a la pingüinera), presentan un mayor grado de heterogeneidad en la comunidad procarionte de sus suelos, ya que comparten un menor número de géneros, comparado con los identificados en los sitios COLL. Esta diferencia puede estar suscitada por la composición del sitio PUNTA-A, ya que los análisis de beta-diversidad reflejan que las muestras de este sitio se diferencian del resto de muestras del sitio PUNTA. Interesantemente, la presencia de vegetación en la cobertura superior del suelo parece, según nuestros análisis de beta-diversidad, no estar modulando fuertemente la comunidad procarionte en estos suelos, ya que no se diferencian con respecto a las muestras PUNTA de suelo desnudo (Figura 10, Figura 17). En esta tesis, la presencia de vegetación se consideró como un factor propio del suelo el cual está incorporado en nuestro transecto de estudio. Sin embargo, no se hicieron análisis en detalle de la composición de la comunidad procarionte propia de la vegetación (por ejemplo de la comunidad endófita o epífita), ya que no formaba inicialmente parte de los objetivos planeados, los cuales se enfocan sólo en la composición del suelo. Teniendo esto en consideración, con nuestros resultados resulta difícil determinar de qué manera la vegetación propia de cada sitio influencia la comunidad microbiana presente en estos suelos antárticos. Sin embargo, una forma de lograr una aproximación para entender este efecto es comparar las muestras con cobertura vegetativa versus las muestras ubicadas paralelas a estas a una misma distancia en el transecto desde la pingüinera, y que corresponden a suelo desnudo. Nuestros resultados apuntan a que en general la comunidad para los cuatro sitios estudiados es similar tanto en composición (abundancia relativa) como a nivel de correlaciones que presentan los ASVs de estos sitios (sus ASVs se agrupan principalmente en un clúster específico presentando correlaciones de Spearman positivas, Figura 17). Por otro lado, a la fecha en la literatura existen pocas publicaciones donde se estudie la comunidad procarionte que está presente en vegetación como la de estos sitios en Isla Decepción, que está formada por musgos de las especies *Sanionia uncinata* y

Polytrichastrum Alpinum. Sin embargo, se ha descrito que en musgos en la especie *Sanionia uncinata* miembros bacterianos de los órdenes Pseudomonadales, Burkholderiales, SAR11 y Flavobacteriales son altamente abundantes en la comunidad endófito (Park *et al.*, 2013). No obstante, en los sitios con presencia de vegetación no encontramos que estos taxones se encuentren abundantes, de manera que es posible que estos microorganismos se encuentren asociados con la vegetación y no formen parte en gran abundancia de la microbiota del suelo. Sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre la composición procarionte de estos musgos para poder establecer una verdadera correlación.

Finalmente, también se estudió el efecto indirecto que potencialmente tienen las heces de los pingüinos al impactar la geoquímica del suelo, y el rol que ejerce sobre la composición del microbioma presente en estos sitios. Nuestros resultados están en concordancia con lo reportado previamente por Guo *et al.*, 2018, donde la comunidad procarionte del suelo más influenciado por la pingüinera, también se ve más afectado por la presencia de compuestos combinados de nitrógeno ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{NO}_3^-\text{-N}$), como también por la presencia de fósforo. En la literatura se ha reportado que el aumento desmesurado de fósforo en suelos ornitogénicos puede inhibir el crecimiento microbiano, lo cual podría repercutir en la diversidad de bacterias presente en estos suelos, puesto que solo permitiría el crecimiento y actividad de algunos grupos especializados (Tscherko, *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestros resultados se observa que los mayores niveles de fósforo total corresponden a los sitios con mayor vegetación, independientemente de su cercanía a la pingüinera, los cuales presentan mayor riqueza y diversidad microbiana que por ejemplo el sitio PUNTA-A con suelo con presencia del alga *Prasiola crispera*. Por otro lado, al evaluar los resultados del análisis CCA y el análisis de redes basado en la correlación de Spearman, se observa que los sitios COLL presentan fuertes correlaciones negativas con los nutrientes aportados por la pingüinera al suelo, lo que explicaría el cambio a nivel de composición microbiana que presentan estos sitios más distantes con respecto a los sitios PUNTA.

6.3.- Efecto de la pingüinera sobre la comunidad de microorganismos diazotróficos

El proceso de fijación biológica de nitrógeno llevado a cabo por los microorganismos diazotróficos es fundamental en los procesos biogeoquímicos (Ortiz *et al.*, 2020). En Antártica, los suelos ornitogénicos acumulan grandes cantidades de nitrógeno, pero no se sabe en detalle cómo este elemento es suplementado en suelos no ornitogénicos (Tatur 2002). Se cree que la fijación biológica de nitrógeno juega un papel clave en estos suelos, ya que es el principal mecanismo de incorporación *de novo* de nitrógeno en un ecosistema natural, compensando así la pérdida de este elemento a causa de la desnitrificación (Díez, *et al.*, 2013). El proceso de fijación de N₂ es sensible a altas concentraciones de oxígeno (a causa de que la enzima nitrogenasa se inactiva), como también a un exceso de amonio y amoniaco que también lo inhibe (Hoffman, *et al.*, 2014). Este sería el caso de los suelos ornitogénicos, caracterizados por un alto contenido de amonio (Tatur 2002). Sin embargo, en la literatura se encuentra poco caracterizado de qué manera la comunidad diazotrófica y su actividad se están viendo influenciados por la presencia de las pingüineras, y cuál sería la zona de influencia sobre este importante grupo funcional. Es por este motivo, que en este trabajo nosotros buscamos complementar el poco conocimiento y caracterización que existe en la literatura sobre microorganismo diazótrofes en suelos bajo la influencia de pingüinos.

La diversidad de los microorganismos diazótrofes se evalúa generalmente mediante el análisis del gen *nifH*, el cual codifica para la dinitrogenasa reductasa. Este gen es uno de los genes más conservados del regulón *nif*, y que tradicionalmente se ha utilizado como un gen marcador para estudiar la diversidad genética de los microorganismos diazotróficos en la naturaleza (Gaby, *et al.*, 2011). Sin embargo, en la literatura actual, no existe un consenso sobre qué partidores son los más idóneos para evaluar la presencia del gen *nifH*. Por lo tanto, en esta tesis se evaluaron diferentes partidores, con el objetivo de tener una visión más completa sobre los potenciales fijadores de nitrógeno presentes en estos suelos de origen volcánico e influenciado por la presencia de una pingüinera. Para ello, se evaluaron tres sets de partidores universales, en vista de que según la literatura cada set presenta un nivel de cobertura sobre diversos grupos taxonómicos que varían según el tipo de muestra

y la presencia de grupos dominantes específicos (Gaby *et al.*, 2012, Angel *et al.*, 2018). Para el caso del set de partidores IGK3-DVV, este presenta un grado de cobertura sobre las secuencias de *nifH* en las bases de datos actuales superior al 90% (Gaby *et al.*, 2012). Sin embargo, este set es capaz de amplificar también secuencias de proteínas homólogas a la subunidad nitrogenasa, tales como secuencias de la protochlorofila reductasa (genes *bchX*, *chlL*, *bchL*) y la proteína de partición cromosomal (gen *parA*). Nuestros resultados apoyan lo descrito previamente, al identificar secuencias asignadas a los modelos ocultos de Markov descrito para chlL-bchL. Bajo este escenario, resulta importante destacar que la identificación del gen *nifH* mediante PCR, podría conducir a interpretaciones erróneas si usamos este set de partidores, siendo la secuenciación masiva *shotgun* una alternativa más idónea para solventar este problema. También es importante mencionar que los enfoques basados en partidores para PCR dirigidos a regiones génicas conservadas, pueden no ser los más acertados para la identificación de secuencias *nifH* frente a la diversidad de estas secuencias en los hábitats antárticos (Ortiz *et al.*, 2018). Esto puede agravarse si los microorganismos antárticos utilizan vías que son raras o están ausentes en otros ecosistemas. Por ejemplo, las nitrogenasas alternativas pueden expresarse y tener una función igual o mejor que las nitrogenasas canónicas de Molibdeno. De hecho, existe evidencia de que la contribución de las nitrogenasas alternativas han sido subestimadas (Bellenger *et al.*, 2020). Teniendo esto en consideración, y dada la imposibilidad por el momento de realizar metagenomas *shotgun* de estas muestras, es que decidimos evaluar la presencia de organismos diazotróficos utilizando otras dos parejas de partidores con diversas coberturas. En el caso de la pareja de partidores Ueda16F-R6, presentan un alto porcentaje de éxito al capturar las secuencias del clúster I y III en estudios *in silico* (Angel *et al.*, 2018). Mientras que, por otro lado, la pareja de partidores PolF-PolR tiene solo un 25% de cobertura sobre las secuencias de *nifH* presente en las bases de datos actuales (Gaby *et al.*, 2012). Sin embargo, estos últimos partidores tienen un gran rendimiento en la amplificación de *nifH* en muestras de suelo, especialmente en las taxa de Alfa-, Beta- y Gammaproteobacteria, Firmicutes y Actinobacterias, mientras que tiene un bajo rendimiento sobre los grupos del clúster IA, Cianobacterias y otras secuencias del clúster III.

Al utilizar la pareja de partidores PolF-PolR, nuestros resultados permitieron identificar secuencias cercanamente asignadas a Nostocales, Burkholderiales y Clostridiales, siendo el primero altamente abundantes en estos suelos. En la literatura, se ha sugerido que en general las cianobacterias con heterocistos como *Nostoc commune*, son los encargados de la fijación de nitrógeno en suelos antárticos, por sobre otras taxa (Ortiz, *et al.*, 2020). Otras cianobacterias Nostocales como *Calothrix*, *Dichothix*, *Nodularia* e *Hydrocorune* también han sido reportados como fijadores de nitrógeno en suelos antárticos (Komárek *et al.*, 2015, Van Goethem *et al.*, 2019, Makhalanyane *et al.*, 2013). Sin embargo, la presencia de vegetación podría dar luces de una potencial interacción musgo-cianobacteria, especialmente si las secuencias corresponden a *Nostoc commune* (Pandey *et al.*, 2004). Por otro lado, previamente en Antártica (Hurd Glacier, Livingston Island) se describió a Burkholderiales (Betaproteobacteria) como potencialmente fijadores de nitrógeno, sugiriéndose que esta taxa pudiese jugar un rol importante en la colonización inicial por medio de la fijación de nitrógeno (Garrido-Benevent *et al.*, 2020). Nuestros resultados apoyan en este sentido a estos estudios previos, al sugerir también su aporte en la incorporación del nitrógeno al suelo. Por otro lado, la presencia de secuencias cercanamente afiliadas a *Clostridium* (tanto con partidores Pol-F/Pol-R como con Ueda19F-R6) potencialmente fijadoras de nitrógeno (reportadas en el presente estudio tanto mediante secuenciación masiva usando PCR, como mediante aproximación vía predicción de funciones metagenómicas usando PICRUSt2), ha sido anteriormente muy poco caracterizada para suelos antárticos. En la última revisión reciente realizada por Ortiz *et al.*, 2020, sobre el ciclo del nitrógeno microbiano en suelos antárticos, no hay información sobre Clostridiales potencialmente fijadores de nitrógeno, o que estén involucrados en procesos del ciclo del nitrógeno en Antártica. En general, *Clostridium* se considera un organismo diazotrófico de vida libre, tal como *Burkholderia*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus*, entre otros (Ali 2018). Este género ha sido reportado como altamente sensible a la presencia de oxígeno molecular, lo que restringe a *Clostridium* a sobrevivir en áreas anaeróbicas tales como suelos sumergidos o en intestino de animales, entre otros. A nivel de 16S rRNA, Guo *et al.*, 2018, reportó que la familia Clostridiaceae (Firmicutes) era más abundante en el sitio correspondiente a una pingüinera de Isla Ardley

en Antártica, y no así para el resto de los sitios en una transecta. Estos autores, por tanto propusieron que la abundancia de este phylum estaría relacionada directamente con la transferencia desde el microbioma intestinal de los pingüinos, de manera similar a lo reportado por Santamans *et al.*, 2017. A partir de estos antecedentes, se puede inferir que la presencia de estos fijadores de nitrógeno estaría principalmente relacionadas con la presencia de la pingüinera, y es por este motivo que no han sido reportados en el resto de suelos de Antártica. Finalmente, en nuestros suelos, también se identificó la presencia de Frankiales por medio de los partidores Ueda19F-R6. En Antártica, se han identificado miembros de la familia Frankiaceae mediante PICRUSt en suelos desnudos de Taylor Valley, McMurdo Dry Valley (De Scally *et al.*, 2016). Sin embargo, en otros ambientes, en general los Actinomycetes del género *Frankia* presentan relaciones simbióticas con diversos tipos de vegetación (no leguminosas), y también interacciones como organismos de vida libre con tallos liquénicos o en suelos (Almendras *et al* 2018). Basado en esto, resulta importante investigar y esclarecer el rol que pudiesen presentar estos microorganismos en relación a la presencia de vegetación como son los musgos *Sanionia uncinata* y *Polytrichastrum alpinum*, con los que pudieran estar quizás teniendo una relación endosimbiótica. Sin embargo, basado en las limitaciones metodológicas de esta tesis no es posible determinar por el momento esta relación, y serán necesarios estudios adicionales en el futuro para poder responder a esta interesante pregunta ahora abierta.

También es importante tener en consideración que la presencia del gen *nifH*, y en general la presencia de los genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno, no necesariamente indican actividad enzimática, o que el proceso en particular se está llevando a cabo en estos sitios. Para poder corroborar esta actividad, en esta tesis y enfocándonos en la fijación de nitrógeno, se realizaron ensayos preliminares de actividad enzimática (ARA) para los sitios PUNTA-PA y PUNTA-BS-SU (**Figura suplementaria S9**). Los resultados muestran actividades de fijación de nitrógeno en estos sitios pero, se hace necesario ahora repetir estos estudios de actividad, que nos permitan corroborar los resultados preliminares observados.

Basado en todo lo anterior, y en lo reportado por Pérez *et al.*, 2016, que muestra como la adición de agua (simulando efectos de derretimiento de hielos y precipitación) en muestras de suelo influenciado por pingüinos presenta efectos positivos sobre la fijación de nitrógeno, resulta importante por tanto considerar el factor humedad como clave en este proceso en el suelo. Además, como este proceso en los suelos suele ser en condiciones anóxicas, la presencia de vegetación pudiese estar jugando un papel clave en este aspecto (Meick *et al.*, 1997). En los parámetros fisicoquímicos que se midieron para esta tesis, no tenemos información sobre las condiciones de O₂ en el suelo. Por lo tanto, resulta importante añadir para futuros estudios esta medición en el suelo, ya que pudiese estar modulando la actividad de potenciales fijadores de nitrógeno en suelos como los de Isla Decepción. Basados en estos antecedentes y resultados, al evaluar de nuevo nuestra hipótesis de trabajo, se observa que en un transecto corto (por ejemplo teniendo en cuenta solo los sitios PUNTA), se cumpliría lo planteado, sin embargo, cuando se añaden los sitios COLL, en donde hay una menor influencia de la pingüinera, no somos capaces de observar la presencia del gen *nifH* mediante PCR, y en una baja abundancia mediante el análisis realizado vía PICRUSt2 (Gavin *et al.*, 2019). Esto probablemente se puede explicar debido a las diferentes condiciones fisicoquímicas tales como la humedad y la presencia de compuestos derivados del nitrógeno de los suelos investigados, las cuales están afectando la presencia de los organismos diazótrofos en los sitios muestreados. De igual forma, si se observan los valores de NH₄⁺-N y NO₃⁻-N, comparándolos entre los sitios PUNTA (excluyendo el sitio PUNTA-A) con los sitios COLL, en general no existen grandes diferencias en la concentración de nitrógeno en estos suelos. Es por este motivo que posiblemente la demanda de nitrógeno realizada por la vegetación es lo que permitiría la aparición de organismos fijadores de nitrógeno (posiblemente también asociados de manera endófito o endosimbionte) en los suelos PUNTA con vegetación, a diferencia de los sitios COLL desnudos.

6.4.- Dinámica del nitrógeno y rol ecológico de los pingüinos

La asignación putativa de vías metabólicas mediante PICRUSt2 y la base de datos *KEGG ORTHOLOGY*, permiten estudiar genes funcionales, siendo estas predicciones sólo indicativos de una capacidad funcional putativa (Gavin *et al.*, 2019). Sin embargo, previos estudios han demostrado que PICRUSt2 y su primera versión, generan un análisis con un resultado confiable (De Scally *et al.*, 2016, Narayan *et al.*, 2020). En nuestro modelo de estudio, usando esta metodología en un contexto de ciclado de nitrógeno, se encontró para el sitio más cercano a la pingüinera (PUNTA-A) una alta abundancia de genes relacionados con el proceso de desnitrificación (*nosZ*, *norB* y *nirK*). Este proceso fue asociado principalmente a miembros de los órdenes Xanthomonadales y Chitinophagales. A menores niveles taxonómicos, miembros del género *Rhodanobacter* (Xanthomonadales), son altamente abundantes en suelos PUNTA-A, los cuales serían los principales responsables de llevar a cabo este proceso en este sitio de la pingüinera, ya que a nivel de 16S rRNA, esta taxa es altamente abundante. De la misma manera, en este sitio afectado directamente por la pingüinera hay una mayor abundancia de los genes *pmoC-amoC* determinado vía PICRUSt2, relacionados con el proceso de oxidación de amonio, y asociados aquí principalmente a Betaproteobacteriales. Si bien la presencia de esta taxa solo tiene una abundancia relativa del 0,74% en el sitio PUNTA-A, la presencia de organismos amonio oxidantes betaproteobacteriales podrían tener su origen por medio de la transferencia del sistema marino, ya que estos microorganismos han sido reportados como altamente abundantes en sedimentos marinos en otras regiones (Nold *et al.*, 2000). Sin embargo, también han sido reportados como una taxa clave implicada en la vía de oxidación de amonio en McKelvey Valley, Antártica (Chan *et al.*, 2013). Finalmente, y como se mencionó previamente, en los sitios PUNTA con vegetación, se encontró también mediante esta metodología mayor presencia de potenciales fijadores de nitrógeno, que estarían incorporando el nitrógeno atmosférico a este ecosistema, tales como Clostridiales, Rhizobiales y Selenomonadales.

En los suelos de la zona costera de Antártica, la transferencia de nutrientes mediante la deposición animal es un elemento clave en el enriquecimiento de estos suelos. De hecho,

los suelos ornitogénicos son descritos como una fuente importante de carbono y nitrógeno en el ecosistema antártico (Burkins *et al.*, 2000). En base a los resultados descritos en esta tesis, podemos sugerir una vez más que los pingüinos son capaces de modificar el microbioma del suelo y los procesos biogeoquímicos relacionados con el nitrógeno. Es por este motivo, que es importante considerar el rol ecológico que cumplen los pingüinos, especialmente la especie de pingüino barbijo, para el cual se ha identificado una disminución en la población de esta especie reportada en función del número de nidos (Barbosa *et al.*, 2012). Se ha reportado como factor determinante en esta disminución, el cambio climático, que trae consigo tanto el desajuste de la dinámica temporal en los ciclos biológicos de estas aves, como también la reducción de las poblaciones de krill antártico (*Euphausia superba*) que son elementos esenciales de la dieta de esta especie de pingüino y en la red trófica de Antártica (Barbosa, 2011, Atkinson *et al.*, 2004, Borkhorst *et al.*, 2019).

7.-Conclusiones

La presencia de la pingüinera Punta Descubierta modula la estructura y composición de la comunidad procariota en los suelos bajo la influencia de pingüinos, en Isla Decepción, Antártica. La presencia de compuestos nitrogenados tales como amonio y nitrato, derivados del guano de los pingüinos, son los que impactan fuertemente en esta comunidad del suelo PUNTA-A. En estos suelos la comunidad presenta una alta abundancia de miembros de las familias Chitinophagaceae y Rhodanobacteraceae. En particular, el género *Rhodanobacter* fue altamente abundante además de presentar genes que reflejan su posible participación en el proceso desnitrificante de estos suelos.

Mediante PCR y vía aproximación bioinformática (PICRUSt2), se identificó la presencia de genes *nifH* asignados a miembros de Nostocales, Burkholderiales, Frankiales y Clostridiales en muestras de suelo PUNTA (160-200 metros con respecto a pingüinera) y con presencia del musgo *Polytrichastrum alpinum* (PUNTA-PA), pero no en la muestra más cercana a la pingüinera PUNTA-A (10 metros) ni en los sitios más distantes COLL (400-1200 metros con respecto a pingüinera). Esto muestra una distribución heterogénea de organismos diazótrofos, que podría en parte ser explicada con un aporte de nutrientes diferencial, y otra debida a una potencial asociación tipo endofítica o endosimbiótica con la vegetación que cubre estos suelos.

8.-Referencias

Aislabie, J., Jordan. S., Ayton. J., Klassen, JL., Barker, GM., Turner, S. Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica. *Canadian Journal of Microbiology* **55**: 21–36. pmid:19190698 (2009).

Almendras, K., García, J., Carú, M., Orlando, J. Nitrogen-Fixing Bacteria Associated with *Peltigera* Cyanolichens and *Cladonia* Chlorolichens. *Molecules* (2018).

Alshibli, Nabilah Ali. Diversity of Free – Living Nitrogen – Fixing Bacteria in Soil of Sioux Prairie of South Dakota. Electronic Theses and Dissertations, South Dakota State University. (2018).

Angel, R., Nepel, M., Panholzl, C., Schimidt, H., et al. Evaluation of primers targeting the diazotroph functional gene and development of NifMAP- A bioinformatics pipeline for analyzing nifH amplicon data. *Frontiers in Microbiology* **9**: 703 (2018).

Alcamán, E., Fernández, C., Delgado, A., Bergman,B., Díez, B. The cyanobacterium *Mastigocladus* fulfills the nitrogen demand of a terrestrial hot spring microbial mat. *ISME Journal* **10**, 2290-2303 (2015).

Atkinson, A., Pakhomov, E., Rothery, P., Siegel, V. Long-term decrease in krill stocks and increase in salps within the Southern Ocean. *Nature*, 432, 100-103 (2004).

Barbera, P., Kozlov, A., Czech.L., Morel, B., Darraiba, D., Flouri, T., Stamatakis, A. EPA-ng: Massively parallel evolutionary placement of genetic sequences. *Systematic Biology*, **68**, 365-369 (2019).

Barbosa, A., Benzal, J., De León, A., Moreno, J. Population decline of chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) on Deception Island, South Shetlands, Antartica. *Polar biology* **35**; 1453-1457 (2012).

Barbosa, A. Efectos del cambio climático sobre pingüinos antárticos. *Ecosistemas* **20**: 33-31 (2011).

Barbosa, A., Balagué, V., Valera, F., Martínez, A., Benzal, J., Motas, M., *et al.* Age-related differences in the gastrointestinal microbiota of chinstrap penguins (*pygoscelis antarctica*). *PLoS One* **11**:e0153215. (2016).

Bendia, A.G., Signori, C.N. *et al.* A Mosaic of Geothermal and Marine Features Shapes Microbial Community Structure on Deception Island Volcano, Antarctica. *Frontiers in Microbiology* **9**:899 (2018).

Bellenger, J.P., Darnajoux, R., Zhang, X., Kraepiel, A.M.L. Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: A review. *Biogeochemistry* **149**, 53–73 (2020).

Bolyen, E., Rideout, JR., Dillon, MR., *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* **37**: 852–857 (2019).

Borkhorst, S., Convey, P., Aerts, R. Nitrogen inputs by marine vertebrates drive abundance and richness in Antarctic terrestrial ecosystem. *Current Biology*, **29**, 1721-1727 (2019).

Boyd, E.S., Costas, A.M.G., Hamilton, T.L., Mus, F., *et al.* Evolution of molybdenum nitrogenase during the transition from anaerobic to aerobic metabolism. *Journal of Bacteriology* **197**, 1690-1699 (2015).

Bronselaer, B., Winton, M. *et al.*, Change in future climate due to Antarctic meltwater. *Nature* **564**, 53-58 (2018).

Brookes, P.C., Powlson, D.S., Jenkinson, D.S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **14**, 319–329 (1982).

Burkins, M.B., Ross, A.V., Chamberlain, P., Wall, D.H. Origin and distribution of soil organic matter in Taylor Valley, Antarctica. *Ecology* **81**, 2377-2391 (2000).

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, **13**(7), 581–583 (2016).
- Canfield, D.E., Glazer, A.N., Falkowski, P.G. The evolution and future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science*, **330**, 192-196 (2010).
- Caut, S., Angulo, E., Pisanu, B., et al. Seabird modulations of isotopic nitrogen on islands. *PLoS ONE* **7** (2012).
- Chapin, D., Bledsoe, C. Nitrogen fixation in arctic plant communities. *Arctic ecosystems in a changing climate: An ecophysiological perspective*, Academic press (1992).
- Chan, Y., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Pointing, S. B., Farrell, R. L. Functional ecology of an Antarctic Dry Valley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(22), 8990–8995 (2013).
- Cheng, Q. Perspectives in biological nitrogen fixation research. *Journal of integrative Plant Biology* **50**, 786-798 (2008).
- Chong, CW., Pearce, DA., Convey, P., Tan, IKP. The identification of environmental parameters which could influence soil bacterial community composition on the Antarctic Peninsula-a statistical approach. *Antarctic Science* **24**: 249-258. (2012).
- Chong, CW., Dunn, MJ., Convey, P., Tan, GA., Wong, RC., Tan, IK. Environmental influences on bacterial diversity of soils on Signy Island, maritime Antarctic. *Polar Biology* **32**:1571-1582. (2009).
- Chua, C.Y., Yong, S.T., González, M.A., Lavin, P. et al. Analysis of bacterial communities of King George and Deception Islands, Antarctica using high-throughput sequencing. *Current Science* **114**, 1701-1705 (2018).
- Chung, E.J., Park, T.S., Jeon, C.O., Chung, Y.R. Chitinophaga oryzae sp. nov., isolated from the rhizosphere soil of rice (Oryza sativa L.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **62**, (2012).

Cifuentes, J. Dinámica e identidad de bacterias portadoras de proteorodopsina en aguas costeras de Bahía Chile, Antártica. (Tesis de magister). Universidad de Chile, Santiago (2019).

Convey, P., Peck, L. Antarctic environmental change and biological responses. *Science Advances* **11**, eaaz0888 (2019).

Convey, P. Antarctic ecosystems. In: Levin SA (ed) Encyclopedia of biodiversity, vol 1. Academic Press, San Diego, pp 171–184. (2001).

Cowan, D.A., Sohm, J.A., Makhalanyane, T.P., et al. Hypolithic communities: important nitrogen sources in Antarctic desert soils. *Environmental microbiology reports* **3**, 581-586 (2011).

D'Angelo, E., Crutchfield, J., M. Vandiviere. Rapid, sensitive, microscale determination of phosphate in water and soil. *Journal of Environmental Quality* **30**:2206–2209 (2001).

Davey, A. *In situ* determination of nitrogen fixation in Antarctica using a high sensitivity portable gas chromatograph. *Australian Journal of Ecology* **7**, 395-402 (1982).

Dennis, P.G., Newsham, K.K., Rushton, S.P., O'Donnell, A.G., Hopkins, D.W. Soil bacterial diversity is positively associated with air temperature in the maritime Antarctic. *Scientific reports* **9**, 2686, (2019).

de Scally, S.Z., Makhalanyane, T.P., Frossard, A., Hogg, I.D., Cowan, D.A. Antarctic microbial communities are functionally redundant, adapted and resistant to short term temperature perturbations. *Soil Biology and Biochemistry* **103**, 160–170 (2016).

Díez, B., Ininbergs, K. Ecological importance of cyanobacteria. *Cyanobacteria; An economic perspective*. John Wiley & Sons (2013).

Dos Santos, P.C., Fang, Z., Mason, S.W., et al. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics*, **13**; 162 (2012).

Ellis, JC. Marine birds on land: a review of plant biomass, species richness, and community composition in seabird colonies. *Plant Ecology*. **181**,227–240 (2005).

Espejo, W., Celis, J.E., Sandoval, M. *et al.* The Impact of Penguins on the Content of Trace Elements and Nutrients in Coastal Soils of North Western Chile and the Antarctic Peninsula Area. *Water Air Soil Pollut* **228**, 116 (2017).

Fernández-Valiente, E., Quesada, A., Howard-Willimas, C., Hawes, I. N₂-fixation in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Microbial ecology*, **42**, 338-349 (2001).

Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton., M.A., et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society* (2013).

Gaby, J.C., Buckley, D.H. A global census of nitrogenase diversity. *Environmental Microbiology* **13**, 1790-1799 (2011).

Gaby, J.C., Buckley, D.H. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase. *PLoS ONE*. **7**, e42149 (2012).

Garrido-Benavent, I., Pérez-Ortega, S., Durán, J., Ascaso, C., Pointing, S.B., Rodríguez-Cielos, R., Navarro, F., de los Ríos, A. Differential Colonization and Succession of Microbial Communities in Rock and Soil Substrates on a Maritime Antarctic Glacier Forefield. *Frontiers in Microbiology* (2020).

Gavin, M. ,Maffei, V., Zaneveld., J., Yurgel, N., Brown, J., Taylor, C., Huttenhower, C., Langille, M. PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *Preprint in BioRxiv* (2019).

Green, J., Bohannan, B.J.M. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends Ecology and Evolution* **21**, 501-507 (2006).

Guo, Y., Wang, N., Li, G., Rosas, G., Zang, J., Ma, Y., *et al.* Direct and indirect effects of Penguin Feces on Microbiomes in Antarctic Ornithogenic Soils. *Frontiers in Microbiology* **9**:552 (2018).

Hansen, J., Ruedy, R., Sato, M. & Lo, K. Global surface temperature change. *Reviews of Geophysics* **48**, RG4004 (2010).

Heller, P., Tripp, H.J., Turk-Kubo, K., Zehr, J.P. ARBitrator: a software pipeline for on-demand retrieval of auto-curated nifH sequences from GenBank. *Bioinformatics* **30**, 2883–2890, (2014).

Heuck, C., Weig, A., Spohn, M. Soil microbial biomass C:N:P stoichiometry and microbial use of organic phosphorus. *Soil Biology and Biochemistry* **85**, 119–129 (2015).

Hoffman, B.M., Lukoyanov, D., Yan, Z.Y., et al. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chemical Reviews* **114**, 4041-4062 (2014).

Hood-Nowotny, R., Umana, N. H., Inselbacher, E., Lachouani, P. O., W. Wanek. Alternative Methods for Measuring Inorganic, Organic, and Total Dissolved Nitrogen in Soil. *Soil Science Society of America Journal* **74**:1018–1027 (2010).

Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., Li, W. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*, (2010).

Hutchinson, G.E. Biogeochemistry of vertebrate excretion. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **96**, 1-554 (1950).

Hyatt, D., Chen, G., LoCascio, P.F. et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**, 119 (2010).

Iannuzi, S. Cuantificación de genes relacionados con procesos claves del ciclo del nitrógeno en suelos antárticos con influencia de asentamientos animales. (Tesis de magister). Universidad de Chile, Santiago. (2018).

Issa, A., Abd-Alla, M.H., Ohyama, T. Nitrogen Fixing cyanobacteria: Future Prospect. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation. Intech Open science* (2014).

Ji, M., Greening, C., Vanwonderghem, I., Carere, C.R., Bay, S.K., Steen, J.A., Montgomery, K., Lines, T.; Beardall, J., Van Dorst, J., et al. Atmospheric trace gases support primary production in Antarctic desert surface soil. *Nature* **552**, 400–403 (2017).

Katoh, K., Standley, DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30(4)**:772-780. (2013).

Kim, OS., Chae, N., Lim, HS., Cho, A., Kim, JH., Hong, SG., et al. Bacterial diversity in ornithogenic soils compared to mineral soils on King George Island, Antarctica. *Journal of Microbiology* 50: 1081–1085 (2012).

Komárek, J., Genuário, D.B., Fiore, M.F., Elster, J. Heterocytous cyanobacteria of the Ulu Peninsula, James Ross Island, Antarctica. *Polar Biology* **38**, 475–492 (2015).

Lee, J., Raymond, B., Bracegirdle, T., *et al.*, Climate change drives expansion of Antarctic ice-free habitat. *Nature* **547**, 49–54 (2017).

Liengen, T. Environmental factors influencing the nitrogen fixation activity of free-living terrestrial cyanobacteria from a high Arctic area, Spitsberg. *Canadian journal of Microbiology*, **45**, 573-581 (1999).

Lindeboom, H.J. The nitrogen pathway in a Penguin Rookery. *Ecology*, **65**, 269-277 (1984).

Line, M. Nitrogen fixation in the sub-Antarctic Macquarie Island. *Polar biology*, **11**: 601-602 (1992).

Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., Knight, R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**;1576–85 (2007).

MacKay, B.A., Fryzuk, M.D. Dinitrogen coordination chemistry: On the biomimetic Bonderlands. *Chemical Reviews* **104**, 385-402 (2004).

Makhalanyane, T.P., Valverde, A., Lacap, D.C., Pointing, S.B., Tun, M.I., Cowan, D.A. Evidence of species recruitment and development of hot desert hypolithic communities. *Environmental Microbiology Rep.* **5**, 219–224 (2013).

McDaniel, P.A., Lowe, D.J., Arnalds, O., Ping, C.-L. Andisols. In: Huang, P.M.; Li, Y; Sumner, M.E. (editors) "Handbook of Soil Sciences. 2nd edition. Vol. 1: Properties and Processes". CRC Press (Taylor & Francis), Boca Raton (2012).

Meick, D.R., Seppelt, R.D. Vegetation patterns in relation to climatic and endogenous changes in Wilkes Land, Continental Antarctica. *Journal of Ecology* **85**:43-56 (1997)

Muñoz-Martín, A., Catalán, M. et al. Upper cristal structure of Deception Island area (Bransfield Strait, Antarctica) from gravity and magnetic modelling. *Antarctic Science*. **17**, 213-224 (2005).

Narayan, N.R., Weinmaier, T., Laserna-Mendieta, E.J. et al. Piphillin predicts metagenomic composition and dynamics from DADA2-corrected 16S rDNA sequences. *BMC Genomics* **21**, 56 (2020).

Nguyen, LT., Schmidt, HA., von Haeseler, A., Minh, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, **32**(1), 268–274. (2015)

Nold, S.C., Zhou, J.Z., Devol, A.H., Tiedje, J.M. Pacific northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the β subdivision of the Proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (10): 4 532-4 535 (2000).

O'Halloran, I. P., Cade-Menun, B. J. Total and Organic Phosphorus, chapter. 24, In: Soil Sampling and Methods of Analysis, 2nd edition (eds. Carter, M. R. and Gregorich, E. G.) CRC Press, Taylor; Francis, Boca Raton, FL, USA, pp. 265–291. (2008).

Olson, J.B., Steppe, T.F., Litaker, R.W., Paerl, H.W. N₂-Fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecology* **36**, 231-238 (1998).

Ortiz, Max., Bosh, J., Coclet, C., Johnson, J., Lebre, P., Salawu-Rotimi, A., Vikram, S., Makhalanyaane, T., Cowan, D. Microbial nitrogen cycling in Antartic Soils. *Microorganisms* **8** (2020).

Otero, X., De la Peña, L., Pérez, A., Osorio, T., Huerta, D. Seabird colonies as important global drivers in the nitrogen and phosphorus cycles. *Nature Communications*, **9** (2018).

Paolo, F., Fricker, H., Padman, L. Volume loss from Antarctic ice shelves is accelerating. *Science* **348**, 327–331 (2015).

Pandey, K., Shukla, S., Shukla, P., Giri, D., Singh, P., Kashyap, A. Cyanobacteria in Antarctica: Ecology, Physiology and Cold adaptation. *Cellular and molecular biology*, **50**: 575-584 (2004).

Papale, M., Conte, A., Mikkonen, A., Michaud, L., La Ferla, R., Azzaro, M., Caruso, G., Paranhos, R., Cabral Anderson, S., Maimone, G., *et al.* Prokaryotic assemblages within permafrost active layer at Edmonson Point (Northern Victoria Land, Antarctica). *Soil Biology & Biochemistry* **123**, 165–179 (2018).

Parfitt, L., Wilson, L. Fundamentals of physical volcanology. *Blackwell Science Ltd.* (2009).

Park, M., Lee, H., Hong, S., Kim, O. Endophytic bacterial diversity of an Antarctic moss, *Sanionia uncinata*. *Antarctic Science* **25**, 51-54 (2013).

Pereira, A., Putzke, J. The Brazilian research contribution to knowledge of the plant communities from Antarctic ice free areas. *The Anais da Academia Brasileira de Ciências* **85** (2013).

Pershina, E.V., Ivanova, E.A., Abakumov, E.V., Andronov, E. E.: The impacts of deglaciation and human activity on the taxonomic structure of prokaryotic communities in Antarctic soils on King George Island. *Antarctic Science*, **30**, 278–288 (2018).

Pérez, C.A., Aravena, J.C., Ivanovich, C., McCulloch, R. Effects of penguin guano and moisture on nitrogen biological fixation in maritime Antarctic soils. *Polar Biology* **40**, 437-448 (2016).

Prakash, O., Green, S.J., Jasrotia, P., Overholt, W.A., Canion, A., Watson, D.B., *et al.* *Rhodanobacter denitrificans* sp. nov., isolated from nitrate-rich zones of a contaminated

aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**: 2457–2462. (2012).

Poly F, Jocteur Monrozier L, Bally R. Improvement in RFLP procedure to study the community of nitrogen fixers in soil through the diversity of *nifH* gene. *Research in Microbiology* 2001; **152**:95–103.

Ramírez-Fernández, L., Trefault, N., Carú, M., Orlando, J. Seabird and pinniped shape soil bacterial communities of their settlements in Cape Shirreff, Antarctica. *PLoS ONE* **14** (2019).

Ramirez-Fernandez, L., Orellana, LH., Johnston., ER., Konstantinidis, KT., Orlando, J. How marine animals impact the microbial communities from Antarctic soils? A metagenomic approach. Comunicación presentada en el congreso I isme latín América (septiembre, 2019).

Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., et al. The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 541-554 (2004).

Rignot, E. *et al.*, Ice-shelf melting around Antarctica. *Science* **341**, 266–2270 (2013).

Robinson, A., King, D., Bramley-Alves, J., Waterman, J., *et al.*, Rapid change in East Antarctic terrestrial vegetation in response to regional drying. *Nature Climate Change* **8**, 879–884 (2018).

Robertson, G. P., Wedin, D., Groffman, P. M., Blair, J. M., Holland, E. M., Nadelhoffer, K. J., Harris, D. Soil carbon and nitrogen availability: nitrogen mineralization and soil respiration potentials. In: *Standard methods of long-term ecological research* (eds. G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe & P. Sollins), pp. 258–271. New York, NY: Oxford University Press. (1999).

Santamans, AC., Boluda, R., Picazo, A., Gil, C., Ramos-Miras, J., Tejedo, P., *et al.* Soil features in rookeries of antarctic penguins reveal sea to land biotransport of chemical pollutants. *PLoS One* **12**:e0181901. (2017).

- Siegert, M., Atkinson, A., Banwell, A., Brandon, M., Convey, P., *et al.*, The Antarctic Peninsula under a 1.5°C global warming scenario. *Frontiers in Environmental Science* **7**, 102 (2019).
- Smellie, J.L., López-Martínez, J. *et al.* Geology and geomorphology of Deception Island. *Cambridge: British Antarctic Survey* (2002).
- Smykla, J., Wolek, J., Barcikowski, A. Zonation of vegetation related to penguin rookeries on King George Island, Maritime Antarctic. *Arctic, Antarctic and Alpine Research*, **39**, 143-151 (2007).
- Spider, T.W., Cowling, J.C. Ornithogenic soils of the Cape Bird Adelie Penguin rookeries, Antarctica. *Polar Biology*, **2**: 199–205 (1984).
- Stomeo, F., *et al.* Abiotic factors influence microbial diversity in permanently cold soil horizons of a maritime-associated Antarctic Dry Valley. *FEMS Microbiology Ecology* **82**, 326-340 (2012).
- Tatur, A. Ornithogenic Ecosystems in the Maritime Antarctic- Formation, development and disintegration. *Ecological Studies. Geoecology of Antarctic Ice- free Coastal Landscapes. Springer; Berlin* 161-184 (2002).
- Tatur, A. Ornithogenic soils of the maritime Antarctic: taxonomic position. *Pol. Polar Stud*, **24 Polar symp, Warszawa**, 297- 299 (1997).
- Torres-Mellado, G., Jaña, R., Casanova-Katny, M. Antarctic hairgrass expansion in the South Shetland archipelago and Antarctic Peninsula revisited. *Polar Biology* (2011).
- Tscherko, D., Bolter, M., Beyer, L., *et al.* Biomass and enzyme activity of two soil transects at King George Island, Maritime Antarctica. *Arctic, Antarctic Alp Res. Institute of Arctic and Alpine Research (INSTAAR), University of Colorado*, **35**, 34-47 (2003).
- Turner, J., Barrand, N., Bracegirdle, T., Convey, P., *et al.*, Antarctic climate change and the environment: An update. *Polar Record* **50**, 237-259 (2014).
- Ugolini, FC, Bockheim, JG. Antarctic soils and soil formation in a changing environment: A review. *Geoderma* **144**:1–8 (2008).

- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* **19**, 703-707 (1987).
- Van Dorst, J., Benaud, N., Ferrari, B. New Insights into the Microbial Diversity of Polar Desert Soils: A Biotechnological Perspective. In *Microbial Ecology of Extreme Environments*; Springer: Cham, Switzerland, pp. 169–183 (2017).
- Van Goethem, M.W.; Cowan, D.A. Role of Cyanobacteria in the Ecology of Polar Environments. In *The Ecological Role of Micro-Organisms in the Antarctic Environment*; Springer Polar Sciences: Cham, Switzerland, pp. 3–23 (2019).
- Vieira, G., López-Martínez, J. et al. Geomorphological observations of permafrost and ground-ice degradation on Deception and Livingston islands, maritime Antarctica. *9th International Conference on Permafrost*. 10.5167/uzh-3320. (2008).
- Vishniac, H. The microbiology of Antarctic soils. In *Antarctic Microbiology*; Friedmann, E.I., Ed.; Wiley-Liss: New York, NY, USA, pp. 297–341 (1993).
- Wang, NF., Zhang, T., Zhang, F., Wang, ET., He, JF., Ding, H, et al. Diversity and structure of soil bacterial communities in the Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology* (2015).
- Weidner, S., Arnold, W., Puhler, A. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-Amplified 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, **62**, 766-771 (1996).
- Wouters, B. et al., Dynamic thinning of glaciers on the southern Antarctic peninsula. *Science* **348**, 899–903 (2015).
- Wright, PA. Nitrogen excretion: Three end products, many physiological roles. *The Journal of Experimental Biology* **198**: 273–281. (1995).

Yergeau, E., Hogues, H., Whyte, L.G., Greer, C.W. The functional potential of high Arctic permafrost revealed by metagenomic sequencing, qPCR and microarray analyses. *ISME Journal* **4**, 1206–1214 (2010).

Zheng, H., Dietrich, C., Radek, R., Brune, A. *Endomicrobium proavitum*, the first isolate of Endomicrobia class. Nov. (phylum *Elusimicrobia*)- an ultramicrobacterium with an unusual cell cycle that fixes nitrogen with a Group IV nitrogenase. *Environmental Microbiology* **18**, 191-204 (2016).

9.-Figuras suplementarias

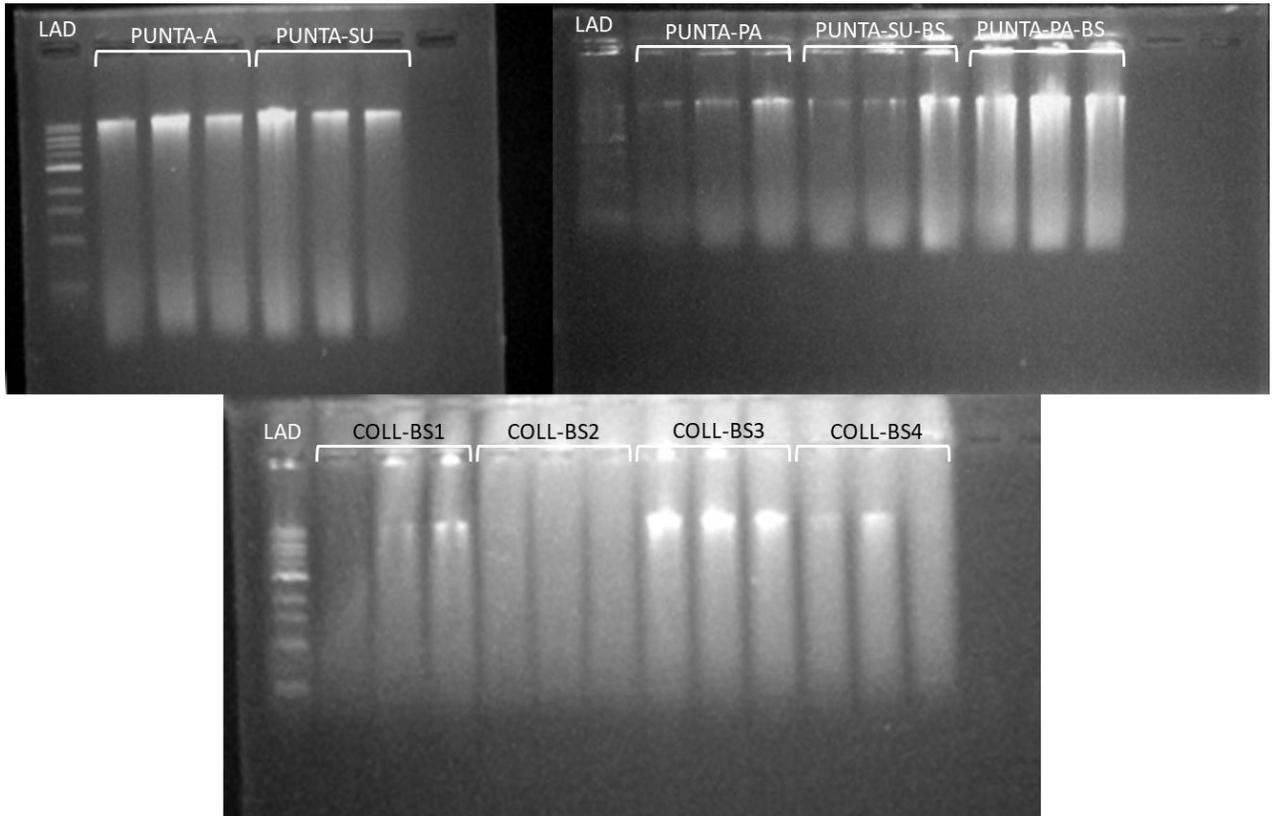


Figura suplementaria S1. Integridad de las muestras de DNA provenientes de suelos antárticos en gel de agarosa 2%

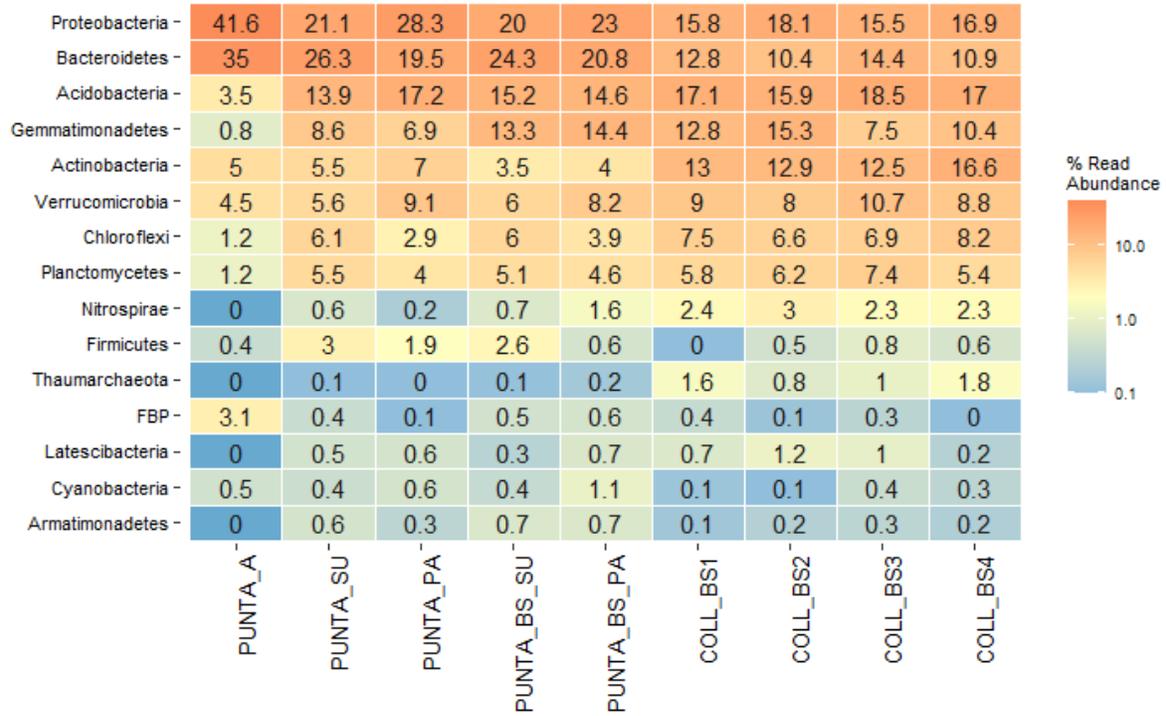


Figura suplementaria S2.- Abundancia relativa promedio por sitio de las 15 taxa más abundantes a nivel de *phylum* en las muestras de suelo antártico.

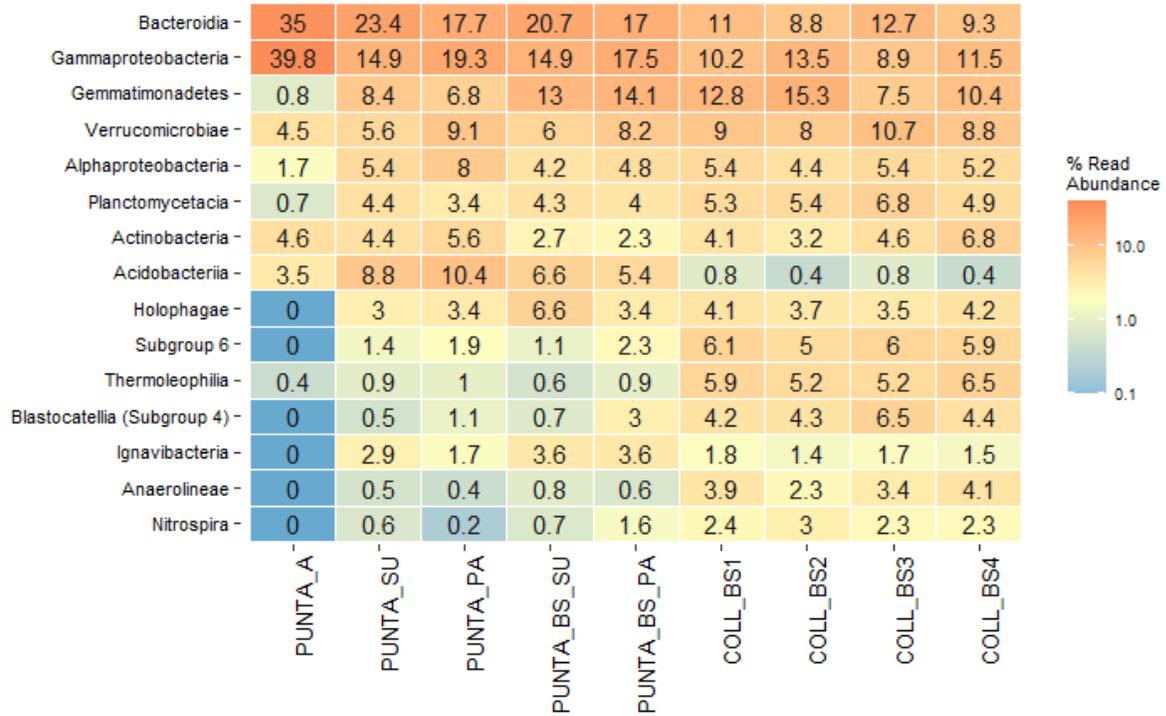


Figura suplementaria S3.- Abundancia relativa promedio por sitio de las 15 taxa más abundantes a nivel de clase en las muestras de suelo antártico.

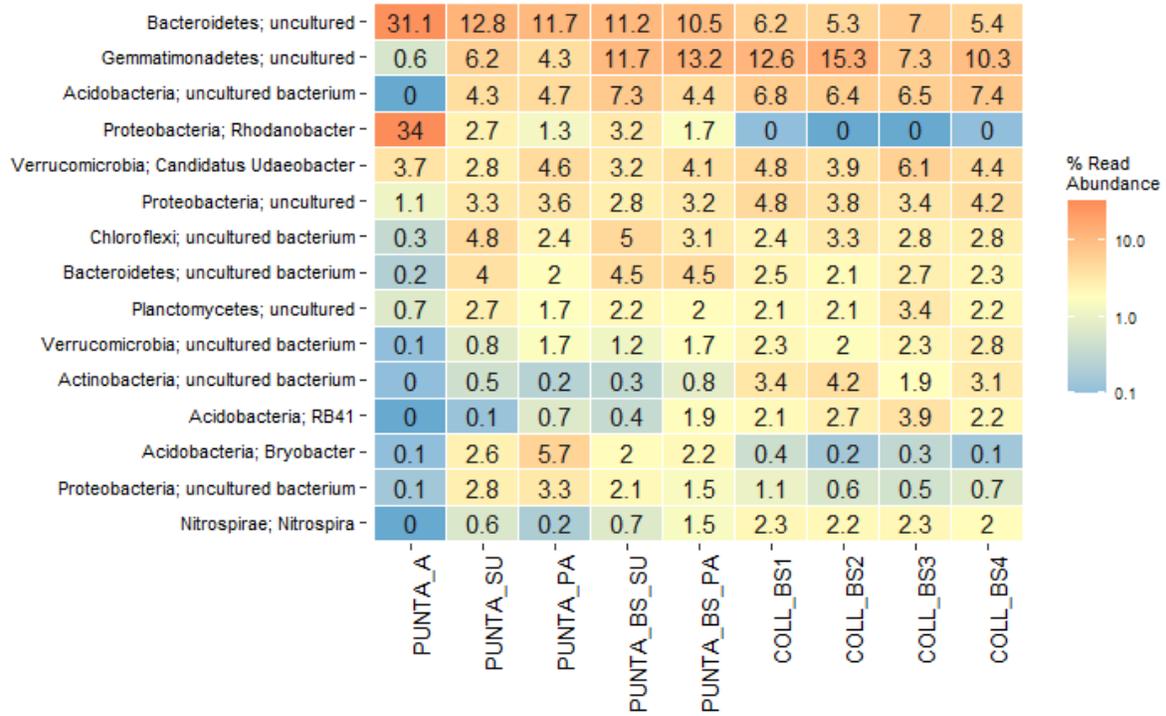
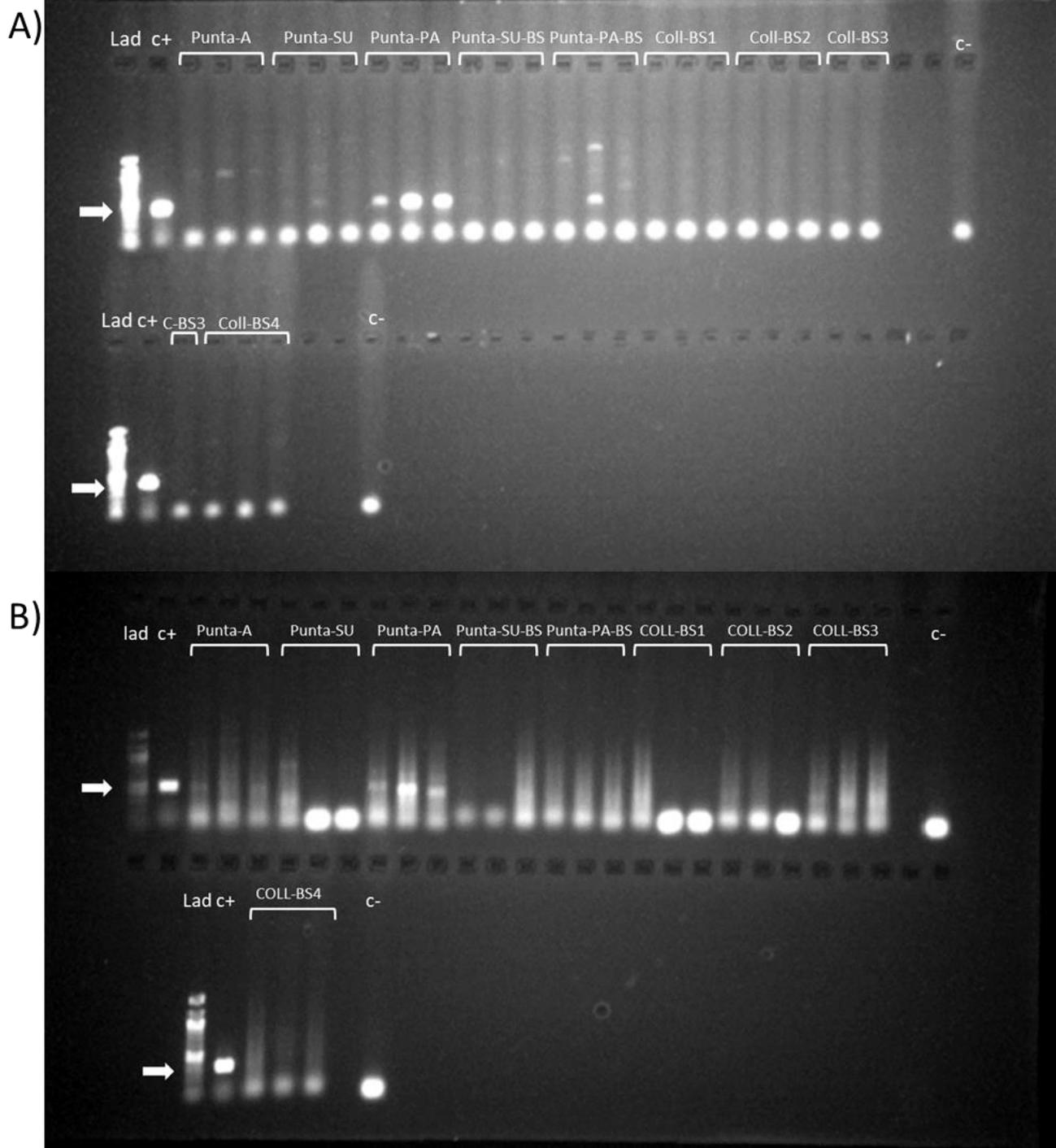


Figura suplementaria S4.- Abundancia relativa promedio por sitio de las 15 taxa más abundantes a nivel de género en las muestras de suelo antártico.



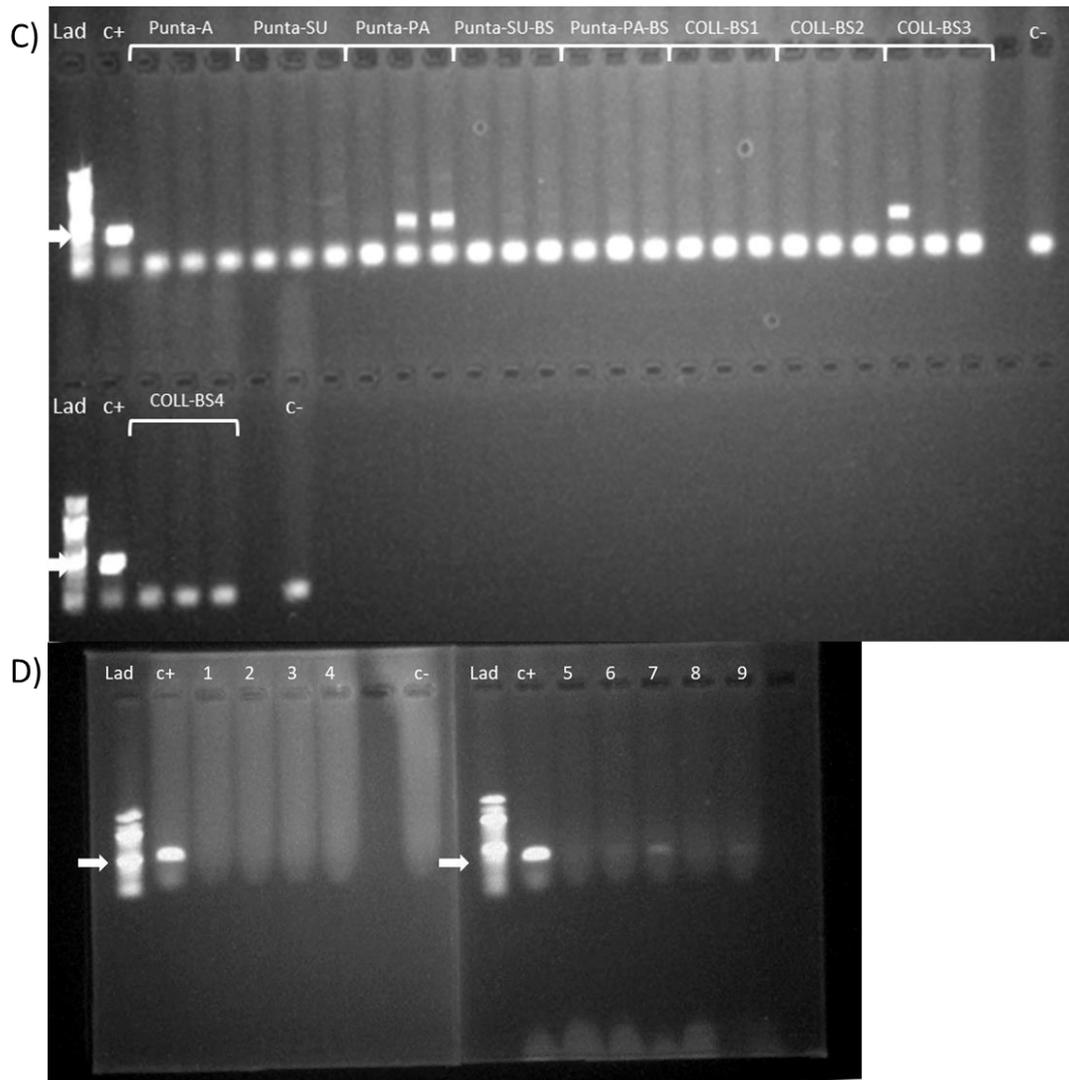


Figura suplementaria S5.- Gel agarosa 1% corrido con productos de amplificación del gen *nifH* en muestras de DNA extraído desde suelo proveniente de Isla Decepción, Antártica (incluye figura página anterior). Lad: Ladder, c+: control positivo (Producto PCR del gen *nifH* de *Fischerella termalis* CHP-1.), c-: control negativo. Para cada sitio se representan los productos PCR del gen *nifH* correspondientes a las 3 réplicas biológicas (Excepto figura D). Figura A, corresponde a productos PCR obtenidos con partidores CNF/CNR. Figura B, corresponde a productos PCR obtenidos con partidores PolF/PolR. Figura C, corresponde a productos PCR obtenidos con partidores UEDA19F/R6. Figura D, corresponde a productos PCR obtenidos con partidores IGK3-DVV; donde 1: Coll-BS1, 2: Coll-BS2, 3: Coll-BS3, 4: Coll-BS4, 5: PUNTA-A, 6: PUNTA-SU, 7: PUNTA-PA, 8: PUNTA-BS-SU, 9: PUNTA-BS-PA.

#	target name	accession	query name	accession	--- full sequence --- E-value	score	bias
#	Zehr_2014_1812genomes_nifH_AA_noGaps	-	H_IGK3DVV_1	-	2.1e-89	289.2	9.7
	chlL-bchL	-	H_IGK3DVV_1	-	6.2e-42	131.5	4.2
	bchX	-	H_IGK3DVV_1	-	6.2e-39	121.3	2.9
	chlL-bchL	-	F_IGK3DVV_1	-	0.00029	8.0	4.9
	Zehr_2014_1812genomes_nifH_AA_noGaps	-	F_IGK3DVV_1	-	0.034	0.9	18.0
	chlL-bchL	-	B_IGK3DVV_1	-	6.2e-89	285.6	4.2
	Zehr_2014_1812genomes_nifH_AA_noGaps	-	B_IGK3DVV_1	-	4.4e-69	222.0	8.9
	bchX	-	B_IGK3DVV_1	-	1.1e-36	114.0	2.9

Figura suplementaria S6: Identificación mediante HMMER/*hmmScan* de secuencias proteicas obtenidas usando los partidores IGK3-DVV. El clon H_IGK3DVV_1 presenta un score de 289.2, teniendo una mayor homología con el modelo oculto de Markov propuesto para la subunidad dinitrogenasa reductasa. En cambio el clon B_IGK3DVV_1 presenta un score de 285.6 para el modelo oculto de Markov propuesto para protoclorofila reductasa, el cual corresponde a una proteína homologa a la dinitrogenasa reductasa.

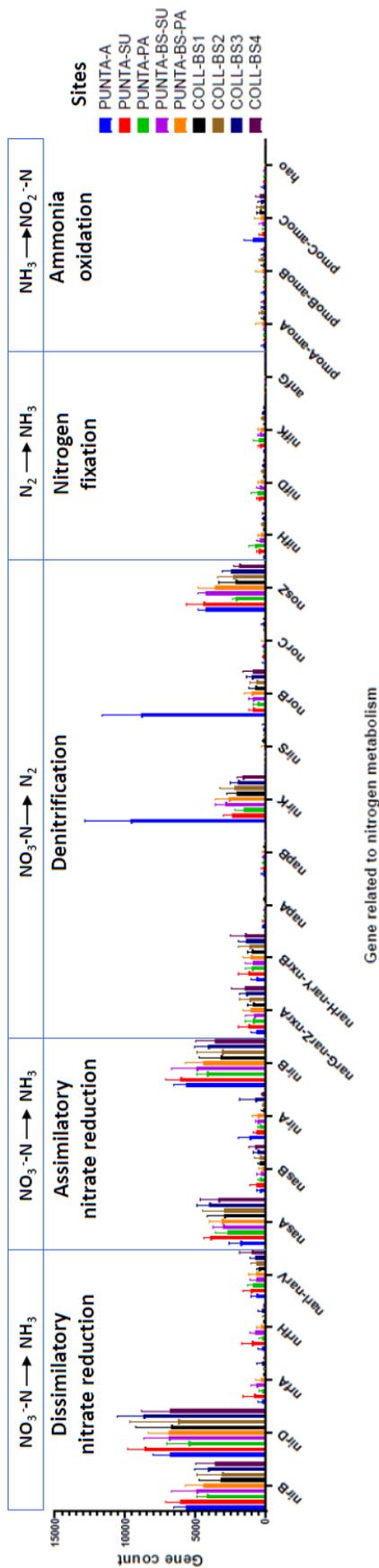


Figura suplementaria S7.- Abundancia de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno a través de predicciones metagenómicas por medio de PICRUSt2. A) Estimación de genes relacionados con distintos procesos del metabolismo del nitrógeno. Se determinaron los genes del metabolismo del nitrógeno bajo la búsqueda en la base de datos del KO (Ver **Tabla 5**)

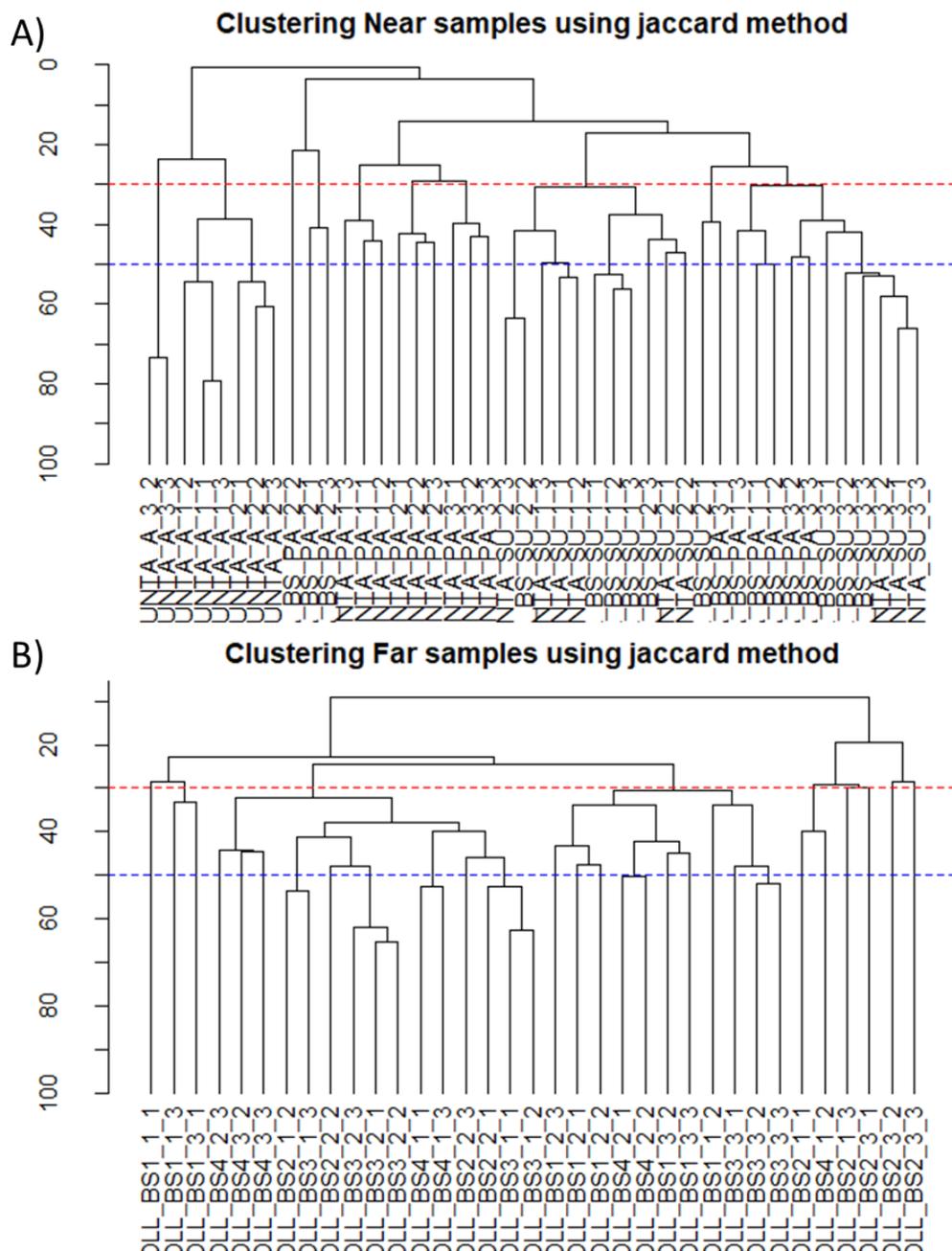
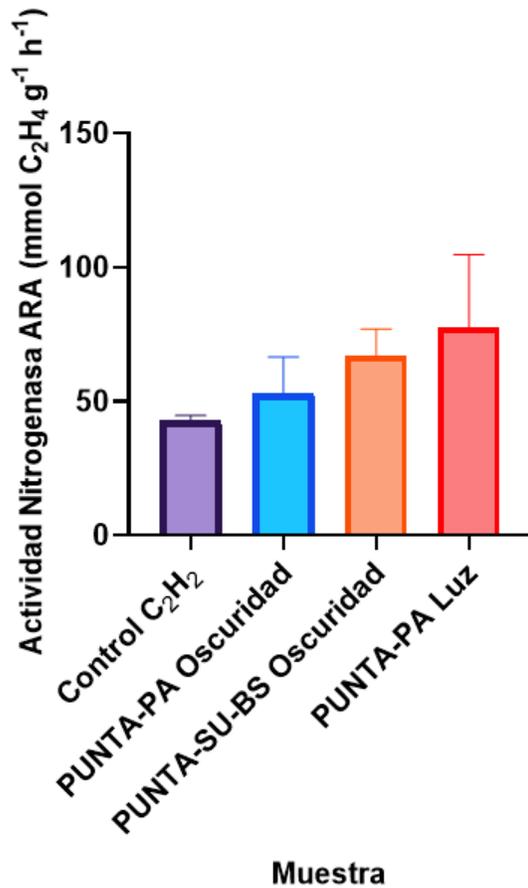


Figura suplementaria S8: Análisis de disimilitud basados en Jaccard. A) Se calculó el índice de Jaccard para las muestras más cercanas a la pingüinera en los sitios PUNTA. B) Se calculó el índice de Jaccard para las muestras más lejana a la pingüinera en los sitios COLL.



Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control C ₂ H ₂ vs. PUNTA-PA Oscuridad	-10.2	-49,89 to 29,50	No	ns	>0,9999
Control C ₂ H ₂ vs. PUNTA-PA Luz	-34.58	5,116 to -74,27	No	ns	0,0909
Control C ₂ H ₂ vs. PUNTA-SU-BS Oscuridad	-24.08	-63,77 to 15,61	No	ns	0,314

Figura suplementaria S9: Ensayos de actividad nitrogenasa (ARA). Se realizó un ANOVA y se obtuvo un p-value de 0,1185, posteriormente se evaluó mediante análisis de múltiples comparaciones con corrección de p-value mediante Bonferroni, identificando la no existencia de diferencias estadísticas (p-value mayor a 0,05) entre las muestras con respecto al control.

10.-Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1.- Identificación y descripción de secuencias *nifH* de referencias.

ID	Descripción
BAP62264.1	nitrogenase [Methanococcus maripaludis OS]
AXB87551.1	nitrogenase [uncultured bacterium]
AHJ12546.1	nitrogenase iron protein NifH [Sulfurospirillum multivorans DSM] Nitrogenase iron protein (Nitrogenase component II) (Nitrogenase Fe protein) (Nitrogenase reductase, Dinitrogenase reductase) [Frankia alni ACNa]
CAJ65436.1	nitrogenase reductase [Limnoraphis robusta CS-]
KKD39790.1	nitrogenase reductase [Sulfurovum sp. FS0-]
KIM06297.1	nitrogenase reductase [Crocospaera subtropica ATCC]
AAB61408.1	nitrogenase reductase [Bradyrhizobium manausense]
KRQ17076.1	nitrogenase reductase [Prosthecomicrobium hirschii]
KPL51681.1	nitrogenase reductase [Leptospirillum ferriphilum YSK]
AIA30843.1	nitrogenase reductase [Mesorhizobium sp. LSHCOB00]
ESX63733.1	nitrogenase iron protein [Sulfurospirillum cavolei]
WP_060826056.1	nitrogenase iron protein [Wolinella succinogenes]
WP_011139245.1	nitrogenase iron protein [Arcobacter anaerophilus]
WP_044419161.1	[Fe-Mo] nitrogenase complex, dinitrogenase reductase component [Arcobacter molluscorum LMG]
AXX93201.1	nitrogenase reductase [Azospirillum sp. TSO-]
PWC54579.1	Nitrogenase iron protein [Sulfurovum sp. enrichment culture clone C]
CUV65475.1	nitrogenase iron protein [Aquaspirillum sp. LM]
WP_077300426.1	nitrogenase iron protein [Methanosarcina mazei]
WP_048048058.1	nitrogenase iron protein [Raoultibacter massiliensis]
WP_102373426.1	Nitrogenase iron protein [Frankia canadensis]
SOU56122.1	nitrogenase reductase [Sulfuricurvum sp. PC0-]
KIM11367.1	nitrogenase reductase [Aphanizomenon flos-aquae 0/KM/D]
KHG41705.1	nitrogenase reductase, partial [Rhizobium sp. Pop]
EJZ16722.1	nitrogenase reductase [Immundisolibacter cernigliae]
ANX02777.1	nitrogenase iron protein [Leptospirillum ferrooxidans]
AAQ12257.1	nitrogenase reductase [Leptolyngbya valderiana BDU 00]
OAB60323.1	nitrogenase reductase [bacterium]
AAK26105.1	MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [Rhodopseudomonas]
WP_011474866.1	nitrogenase iron protein [Sulfuricella sp. T0]
WP_059419395.1	nitrogenase iron protein [Siculibacillus lacustris]
WP_131307352.1	nitrogenase iron protein [Methylobacterium sp. WSM]
WP_018260199.1	0 MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [Rhodoferax]
WP_078365407.1	nitrogenase iron protein [Candidatus Accumulibacter phosphatis]
WP_034952043.1	nitrogenase iron protein [Roseiarcus fermentans]
WP_113892793.1	nitrogenase iron protein [Azoarcus communis]
WP_108949291.1	

TJV45903.1 nitrogenase iron protein [Mesorhizobium sp.]
 WP_135441479.1 nitrogenase iron protein [Haliea sp. SAOS-]
 QLE58880.1 nitrogenase iron protein [Nostoc sp. TCL-0]
 QLE53476.1 nitrogenase iron protein (plasmid) [Nostoc sp. C0]
 [Fe-Mo] nitrogenase complex, dinitrogenase reductase component
 QKF65622.1 [Arcobacter venerupis]
 WP_011320742.1 MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [Nostocaceae]
 WP_096602689.1 nitrogenase iron protein [Calothrix sp. NIES-00]
 WP_096569143.1 nitrogenase iron protein [Scytonema sp. NIES-0]
 WP_024791553.1 nitrogenase iron protein [Lebetimonas sp. JS0]
 WP_019491592.1 nitrogenase iron protein [Calothrix sp. PCC 0]
 WP_096687110.1 0 MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [unclassified Calothrix]
 WP_100897265.1 nitrogenase iron protein [Nostoc flagelliforme]
 WP_013192381.1 nitrogenase iron protein [Trichormus azollae]
 WP_096578486.1 MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [Nostocales]
 WP_041037193.1 MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [Nostocales]
 WP_016867592.1 MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [Fischerella]
 WP_015205670.1 nitrogenase iron protein [Cylindrospermum stagnale]
 WP_015141658.1 nitrogenase iron protein [Nostoc sp. PCC]
 WP_028986272.1 nitrogenase iron protein [Thermicanus aegyptius]
 WP_096553644.1 nitrogenase iron protein [Nostoc sp. NIES-0]
 WP_103668902.1 nitrogenase iron protein [Pseudanabaena sp. BC0]
 WP_083616352.1 nitrogenase iron protein [Planktothrix sarta]
 WP_038089186.1 nitrogenase iron protein [Tolypothrix bouteillei]
 WP_013460359.1 nitrogenase iron protein [Sulfuricurvum kujiense]
 WP_094531215.1 nitrogenase iron protein [Pseudanabaena sp. SR]
 WP_138500879.1 nitrogenase iron protein [Nostoc sp. PA--]
 WP_024953528.1 nitrogenase iron protein [Sulfurospirillum arcachonense]
 TAF19300.1 nitrogenase iron protein [Nostocales cyanobacterium]
 WP_186407936.1 nitrogenase iron protein [Candidatus Accumulibacter aalborgensis]
 QLH40002.1 nitrogenase iron protein [Defluviicoccus sp.]
 WP_172640016.1 nitrogenase iron protein [Desulfovibrio sp. X]
 WP_169365197.1 nitrogenase iron protein [Pseudanabaena yagii]
 WP_169217771.1 nitrogenase iron protein [Brasilonema sp. Ufv-L]
 WP_169157223.1 nitrogenase iron protein [Brasilonema bromeliae]
 CAB3392186.1 Nitrogenase iron protein [Kyrpidia spormannii]
 CAB1127965.1 Nitrogenase iron protein [Firmicutes bacterium R0]
 WP_166271360.1 nitrogenase iron protein [Chromatiaceae bacterium No.]
 CAA7615888.1 Nitrogenase iron protein [Magnetospirillum sp. SS-]
 WP_162398816.1 nitrogenase iron protein [Nostoc sp. B(0)]
 WP_156801930.1 nitrogenase iron protein [Desulfurispora thermophila]
 CKH23257.1 nitrogenase iron protein [Corynebacterium diphtheriae]
 VUX46239.1 Nitrogenase iron protein [Candidatus Defluviicoccus seviourii]
 WP_069969273.1 nitrogenase iron protein [Desertifilum sp. IPPAS B-0]
 KAB2935892.1 nitrogenase iron protein [Candidatus Contendobacter sp.]

GEO40928.1 nitrogenase iron protein [Skermanella aerolata]
 TQV61864.1 nitrogenase iron protein [Sulfurovum sp.]
 WP_127052204.1 nitrogenase iron protein [Trichormus variabilis]
 WP_073592976.1 nitrogenase iron protein [Phormidium ambiguum]
 PJE71819.1 nitrogenase iron protein [Sulfurimonas sp. CGO big fil rev 00]
 DAB31782.1 TPA: nitrogenase iron protein [Sulfurospirillum sp. UBA0]
 KZR83175.1 Nitrogenase iron protein [Prochlorococcus marinus str. MIT]
 AJK68566.1 nitrogenase iron protein [Corynebacterium marinum DSM]
 CBH36741.1 probable nitrogenase iron protein [uncultured archaeon]
 ABP70147.1 nitrogenase iron protein subunit NifH [Rhodobacter sphaeroides ATCC 0]
 EJW09446.1 Nitrogenase reductase and maturation protein NifH [Rhodovulum sp. PH0]
 nitrogenase subunit NifH (ATPase)-like protein [Sphaerochaeta globosa str. Buddy]
 ADY12563.1
 SDO20003.1 nitrogenase iron protein NifH [Eubacterium maltosivorans]
 WP_042697693.1 MULTISPECIES: nitrogenase subunit NifH [Methanocorpusculum]
 RLL82559.1 nitrogenase subunit NifH [Mesotoga sp. HOpep..]
 RCV63277.1 nitrogenase iron protein NifH [Methanophagales archaeon]
 RCV63054.1 nitrogenase iron protein NifH [Methanophagales archaeon]
 Nitrogenase subunit NifH (ATPase)-like protein [Candidatus Promineofilum breve]
 CUS05575.1
 SNB66310.1 Nitrogenase subunit NifH (ATPase) [Pseudomonas sp. LAILHWK:I]
 SES02316.1 nitrogenase iron protein NifH [Propionibacterium cyclohexanicum]
 nitrogenase subunit NifH (ATPase)-like protein [Dehalococcoides mccartyi IBARAKI]
 BAS32523.1
 BAI64631.1 nitrogenase subunit NifH [Rothia mucilaginosa DY-]
 AII58570.1 nitrogenase subunit NifH [Dehalococcoides mccartyi CG]
 WP_014270590.1 nitrogenase subunit NifH [Sphaerochaeta pleomorpha]
 ABS56522.1 nitrogenase iron protein [Methanoregula boonei A]
 AEG15744.1 Nitrogenase iron protein [Desulfofundulus kuznetsovii DSM]
 ABS65347.1 nitrogenase iron protein [Xanthobacter autotrophicus Py]
 EEZ60752.1 putative nitrogenase iron protein [Slackia exigua ATCC 00]
 BAD77946.1 nitrogenase Mo-Fe protein alpha chain, partial [Herbaspirillum sp. B0]
 PWB49690.1 nitrogenase iron protein [Candidatus Methanoperedenaceae archaeon]
 PTV89819.1 Mo-nitrogenase iron protein subunit NifH [Geobacter sp. DSM 0]
 GAW67117.1 nitrogenase iron protein [Geobacter pelophilus]
 KKH90485.1 nitrogenase iron protein [Methanosarcina mazei]
 AKB81444.1 nitrogenase reductase-like protein [Methanosarcina barkeri]
 CCG09764.1 Nitrogenase iron protein [Pararhodospirillum photometricum DSM]
 AAB07741.1 nitrogenase alpha subunit, partial [Rhizobium etli]
 nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain, partial [Azorhizobium caulinodans ORS]
 BAF75939.1
 CAE55888.1 nitrogenase MoFe protein subunit, partial [Methylobacter luteus]
 nitrogenase MoFe protein subunit, partial [Methylococcus capsulatus str. Texas = ATCC 0]
 CAE55886.1
 EDY82020.1 nitrogenase iron protein [Verrucomicrobiae bacterium DG]

ABO35825.1	nitrogenase iron protein [Methanococcus maripaludis C]
EDR47181.1	putative nitrogenase iron protein [Dorea formicigenerans ATCC]
CAE55889.1	nitrogenase MoFe protein subunit, partial [Methylocystis echinoides]
CAE55884.1	nitrogenase MoFe protein subunit, partial [Methylosinus trichosporium OBb]
CAE55882.1	nitrogenase MoFe protein subunit, partial [Methylocella silvestris BL]
CAE55879.1	nitrogenase MoFe protein subunit, partial [Beijerinckia indica subsp. indica ATCC 0]
VDC17340.1	Nitrogenase iron protein [Rhodobacteraceae bacterium THAF]
RLB63994.1	nitrogenase iron protein [Deltaproteobacteria bacterium]
PTN07708.1	Mo-nitrogenase iron protein subunit NifH [Mangrovibacterium marinum]
PRP94280.1	Nitrogenase iron protein [Enhygromyxa salina]
SMX31862.1	Nitrogenase iron protein [Maliponia aquimaris]
SMY07074.1	Nitrogenase iron protein [Flavimaricola marinus]
SLN31407.1	Nitrogenase iron protein [Roseisalinus antarcticus]
SLN57630.1	Nitrogenase iron protein [Roseovarius gaetbuli]
SLN57259.1	Nitrogenase iron protein [Roseivivax jejudonensis]
SLN32856.1	Nitrogenase iron protein [Pseudooctadecabacter jejudonensis]
CUH60557.1	Nitrogenase iron protein [Thalassobacter stenotrophicus]
ALK91376.1	Nitrogenase iron protein [Limnohabitans sp. ODPR]
KIT14907.1	Nitrogenase iron protein [Jannaschia aquimarina]
AKB52158.1	nitrogenase reductase-like protein [Methanosarcina barkeri str. Wiesmoor]
AKB16518.1	nitrogenase reductase-like protein [Methanosarcina thermophila CHTI-]
CAD56231.1	dinitrogenase beta subunit, partial [Paenibacillus durus]

Tabla suplementaria S2.- Identificación de mejores hits vía BlastP de ASVs identificados en muestras de suelo.

Secuencia interés	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession	
bc636-POL- PRIMERS (PUNTA PA)	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	199	199	100%	3.00E- 64	93.33%	ATN29190.1	
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	199	199	100%	4.00E- 64	93.33%	ATG30588.1	
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	198	198	100%	6.00E- 64	93.33%	ARA13680.1	
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	198	198	100%	1.00E- 63	92.38%	ATG28841.1	
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	198	198	100%	1.00E- 63	92.38%	AEB97066.1	
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	198	198	100%	2.00E- 63	92.38%	ATG28660.1	
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	197	197	100%	2.00E- 63	92.38%	ATG28705.1	
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	197	197	100%	2.00E- 63	92.38%	ARA13702.1	
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	197	197	100%	2.00E- 63	92.38%	APP90089.1	
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	197	197	100%	3.00E- 63	92.38%	AEB97041.1	
	2e747-cffe8- b85ee	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	213	213	100%	2.00E- 69	100.00%	ABU86436.1
	POL-PRIMERS (PUNTA PA)	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	209	209	100%	3.00E- 68	98.11%	ABU86471.1
nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]		207	207	100%	3.00E- 67	97.17%	ABU86473.1	

	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	206	206	97%	5.00E-67	100.00%	ASN77778.1
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	203	203	100%	1.00E-65	95.28%	ARA14614.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	203	203	100%	1.00E-65	95.28%	CAN89701.1
	dinitrogenase reductase [uncultured Antarctic bacterium]	202	202	100%	4.00E-65	93.40%	ACK43210.1
	NifH [uncultured bacterium]	199	199	100%	7.00E-64	91.51%	AI178894.1
	nitrogenase iron protein [Bacteroidetes bacterium]	204	204	100%	8.00E-64	94.34%	NWJ51389.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	199	199	100%	8.00E-64	91.51%	ACC95184.1
Secuencia interés	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
c2098-c5b22-08e5f	NifH [uncultured soil bacterium]	211	211	100%	1.00E-68	100.00%	ABG80812.1
POL-PRIMERS (PUNTA PA)	nitrogenase [uncultured marine bacterium]	210	210	100%	1.00E-68	100.00%	BAQ19942.1
	NifH [uncultured soil bacterium]	210	210	100%	2.00E-68	100.00%	ABG80974.1
	NifH [uncultured soil bacterium]	210	210	100%	3.00E-68	100.00%	ABG80825.1
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	211	211	100%	3.00E-68	99.04%	AZM69044.1
	nitrogenase protein [uncultured bacterium]	210	210	100%	3.00E-68	100.00%	ABY25335.1
	dinitrogenase reductase [uncultured nitrogen-fixing bacterium]	209	209	100%	4.00E-68	99.04%	AEE87232.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	211	211	100%	4.00E-68	99.04%	AAT48916.1
	nitrogenase iron subunit [uncultured Sinorhizobium sp.]	211	211	100%	4.00E-68	99.04%	AGI96629.1
	nitrogenase reductase [uncultured bacterium]	209	209	100%	4.00E-68	99.04%	ACI14144.1

Secuencia interés	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
8280e-POL- PRIMERS (PUNTA PA)	NifH [uncultured bacterium] nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	209	209	100%	3.00E- 68	99.04%	ADY11714.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	208	208	99%	7.00E- 68	99.03%	AEB96941.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	211	211	100%	3.00E- 68	98.08%	AHN51880.1
	dinitrogenase reductase [uncultured nitrogen-fixing bacterium]	209	209	100%	3.00E- 68	98.08%	AEE87228.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	211	211	100%	3.00E- 68	98.08%	AHN51897.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	211	211	100%	3.00E- 68	98.08%	AHN51965.1
	dinitrogenase reductase Fe protein [uncultured bacterium]	209	209	100%	4.00E- 68	98.08%	AAO67608.1
	nitrogenase Fe protein [uncultured bacterium]	209	209	100%	5.00E- 68	98.08%	CAC85903.1
	dinitrogenase reductase [uncultured soil bacterium]	210	210	100%	6.00E- 68	98.08%	ACI26185.1
	dinitrogenase reductase [uncultured nitrogen-fixing bacterium]	209	209	100%	7.00E- 68	98.08%	AAZ06669.1

Secuencia interés	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
167bf-f5bfd POL-PRIMERS (PUNTA PA)	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	202	202	100%	3.00E- 65	94.23%	ARA12625.1
	NifH [uncultured soil bacterium]	201	201	100%	6.00E- 65	93.27%	ABG80881.1
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	201	201	100%	7.00E- 65	93.27%	ARA14313.1
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	200	200	100%	1.00E- 64	93.27%	ARA12850.1

	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	199	199	100%	2.00E-64	93.27%	ABU86549.1
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	199	199	100%	2.00E-64	92.31%	ARA12944.1
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	199	199	100%	2.00E-64	93.27%	ARA12860.1
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	199	199	100%	3.00E-64	93.27%	ARA13719.1
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	199	199	99%	3.00E-64	94.17%	ARA12669.1
	nitrogenase iron protein [uncultured bacterium]	199	199	100%	3.00E-64	93.27%	ABU86428.1
Secuencia interés	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
a032c-9d8d9	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	206	206	100%	2.00E-66	95.19%	ALB34978.1
POL-PRIMERS (PUNTA PA)	dinitrogenase reductase [uncultured nitrogen-fixing bacterium]	204	204	100%	4.00E-66	95.19%	AEE87229.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	204	204	100%	1.00E-65	94.23%	ALL25732.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	203	203	100%	3.00E-65	93.27%	AAT48911.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	202	202	100%	4.00E-65	93.27%	AAV68977.1
	nitrogenase [uncultured bacterium]	202	202	100%	5.00E-63	93.27%	AXB87549.1
	nitrogenase [uncultured bacterium]	199	199	100%	9.00E-62	93.27%	AXB87574.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	202	202	100%	9.00E-65	92.31%	ALB34923.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	202	202	100%	1.00E-64	92.31%	AAT48914.1

Secuencia interés	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	202	202	100%	1.00E- 64	92.31%	AAT48912.1
3db9f-be226- ea711-6b1de	nitrogenase [uncultured bacterium]	214	214	100%	2.00E- 67	100.00%	AXB87573.1
0bcd9-4ce22- 8fd47-cf047	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	207	207	100%	6.00E- 67	96.15%	AAT77217.1
1020e-63527	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	207	207	100%	6.00E- 67	96.15%	ALB34977.1
POL-PRIMERS (PUNTA PA)	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	207	207	100%	6.00E- 67	96.15%	AAT77211.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	207	207	100%	6.00E- 67	96.15%	ALL25755.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	207	207	100%	1.00E- 66	96.15%	ALL25756.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	207	207	100%	1.00E- 66	95.19%	AAT77213.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	206	206	100%	3.00E- 66	95.19%	AAT77216.1
	dinitrogenase reductase [uncultured bacterium]	206	206	100%	3.00E- 66	95.19%	AAT77212.1
	nitrogenase [uncultured bacterium]	207	207	100%	1.00E- 64	95.19%	AXB87574.1
af972-UEDA PRIMERS (PUNTA PA)	dinitrogenase reductase [Acetobacterium woodii DSM 1030]	220	220	100%	9.00E- 72	93.33%	AAF60984.1
	MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [Acetobacterium]	227	227	100%	1.00E- 72	93.33%	WP_026395011.1
	nitrogenase iron protein [Acetobacterium bakii]	226	226	100%	2.00E- 72	94.17%	WP_050740289.1
	nitrogenase iron protein [Acetobacterium fimetarium]	227	227	100%	2.00E- 72	94.17%	WP_186842496.1

	nitrogenase iron protein [Acetobacterium paludosum]	225	225	100%	1.00E-71	93.33%	WP_148567439.1
	nitrogenase iron protein [Acetobacterium sp. KB-1]	229	229	100%	3.00E-73	94.17%	WP_111889021.1
	nitrogenase iron protein [Acetobacterium tundrae]	226	226	100%	4.00E-72	94.17%	WP_148605226.1
	nitrogenase iron protein [Clostridium sp. DJ247]	224	224	100%	1.00E-71	91.67%	WP_185652606.1
	nitrogenase reductase [uncultured bacterium]	223	223	100%	2.00E-73	94.17%	APA22233.1
	nitrogenase reductase [uncultured bacterium]	220	220	100%	4.00E-72	92.50%	APA22232.1
Secuencia interés	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
52892-UEDA PRIMERS (PUNTA PA)	nitrogenase iron protein [Moorella sp. E306M]	164	164	100%	2.00E-48	91.01%	WP_141304474.1
	Nitrogenase iron protein [Desulfofundulus kuznetsovii DSM 6115]	163	163	100%	4.00E-48	91.01%	AEG16830.1
	nitrogenase iron protein [Carboxydotherrmus pertinax]	164	164	100%	3.00E-48	89.89%	WP_075859892.1
	nitrogenase iron protein [Moorella sp. E308F]	163	163	100%	4.00E-48	89.89%	WP_141263915.1
	MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [Moorella]	163	163	100%	4.00E-48	89.89%	WP_054936574.1
	nitrogenase iron protein [Thermodesulfitimonas autotrophica]	163	163	100%	7.00E-48	89.89%	WP_123927773.1
	MULTISPECIES: nitrogenase iron protein [Desulfofundulus]	162	162	100%	1.00E-47	89.89%	WP_072867214.1

nitrogenase iron protein [Moorella thermoacetica]	165	165	100%	1.00E-48	88.76%	WP_071521047.1
nitrogenase iron protein [Calderihabitans maritimus]	162	162	100%	1.00E-47	88.76%	WP_088554943.1
nitrogenase iron protein [Thermacetogenium phaeum]	162	162	100%	1.00E-47	88.76%	WP_015049976.1

Secuencia interés	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
-------------------	-------------	-----------	-------------	-------------	---------	------------	-----------

9f94e-UEDA

PRIMERS

(PUNTA PA)



nitrogenase [uncultured bacterium]	160	160	100%	2.00E-48	100.00%	AXB87571.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	160	160	100%	5.00E-47	100.00%	AXB87573.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	155	155	100%	3.00E-46	96.05%	AXB87559.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	158	158	100%	5.00E-46	97.37%	AXB87548.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	157	157	100%	1.00E-45	97.37%	AXB87549.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	157	157	100%	2.00E-45	98.68%	AXB87574.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	151	151	100%	1.00E-44	93.42%	AXB87543.1
nitrogenase iron protein [Frankia irregularis]	142	142	100%	5.00E-40	86.84%	WP_091273463.1
nitrogenase reductase [Calothrix sp. NIES-4071]	138	138	100%	6.00E-40	86.84%	BAZ11525.1
hypothetical protein DSM106972_058560 [Calothrix desertica PCC 7102]	137	137	100%	7.00E-40	86.84%	RUT02378.1

Secuencia interés	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
-------------------	-------------	-----------	-------------	-------------	---------	------------	-----------

3c79f-UEDA

PRIMERS

(PUNTA PA)

nitrogenase [uncultured bacterium]	159	159	100%	6.00E-48	100.00%	AXB87571.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	159	159	100%	1.00E-46	100.00%	AXB87573.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	155	155	100%	4.00E-45	98.68%	AXB87574.1

nitrogenase [uncultured bacterium]	157	157	100%	1.00E- 45	97.37%	AXB87548.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	155	155	100%	3.00E- 45	97.37%	AXB87549.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	142	142	90%	2.00E- 40	97.10%	AXB87552.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	154	154	100%	7.00E- 46	96.05%	AXB87559.1
nitrogenase [uncultured bacterium]	150	150	100%	4.00E- 44	93.42%	AXB87543.1
nitrogenase iron protein [Planktothrix sp. FACHB-1375]	143	143	100%	3.00E- 40	89.47%	MBD2180557.1
nitrogenase iron protein [Candidatus Frankia meridionalis]	142	142	100%	4.00E- 40	89.47%	WP_131747198.1

Tabla suplementaria S3.- Estadística asociada a índices de Alfa-Diversidad

Medida	ShapiroTest (p-value)		KruskalWallis (p-value)						
n°observado OTUS	3.28E-05		7.60E-06						
Goods Coverage	0.0001227		0.008862						
Chao1	0.03439		1.13E-05						
Shannon	1.53E-09		2.74E-05						
Pairwise-Wilcox Test (p-value)									
N°obsOTUS	G1	G2	G3	G4	S1	S2	S3	S4	S5
G2	0.1946	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	0.3472	0.0222	-	-	-	-	-	-	-
G4	0.5476	0.2994	0.0687	-	-	-	-	-	-
S1	0.0025	0.0254	0.0025	0.0025	-	-	-	-	-
S2	0.7896	0.0893	0.8372	0.2994	0.0015	-	-	-	-
S3	0.0893	0.7896	0.0035	0.0655	0.0029	0.0274	-	-	-
S4	0.7896	0.1946	0.1323	1	0.0025	0.3472	0.0893	-	-
S5	1	0.1251	0.2994	0.5149	0.0015	0.6789	0.0222	0.5476	-
Good Coverage	G1	G2	G3	G4	S1	S2	S3	S4	S5
G2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	0.259	0.14	-	-	-	-	-	-	-
G4	0.911	0.989	0.124	-	-	-	-	-	-
S1	0.259	0.259	0.028	0.259	-	-	-	-	-
S2	0.79	0.691	0.306	0.553	0.047	-	-	-	-
S3	0.984	0.79	0.259	0.751	0.105	0.848	-	-	-
S4	0.691	0.79	0.071	0.693	0.259	0.272	0.587	-	-
S5	0.587	0.66	0.071	0.628	0.591	0.259	0.553	0.975	-
Chao1	G1	G2	G3	G4	S1	S2	S3	S4	S5
G2	0.33182	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	0.25076	0.04215	-	-	-	-	-	-	-
G4	0.71256	0.56837	0.08629	-	-	-	-	-	-
S1	0.02029	0.27396	0.00099	0.02029	-	-	-	-	-
S2	0.1459	0.02029	0.56837	0.04215	0.00099	-	-	-	-
S3	0.16904	0.81892	0.00173	0.19533	0.04823	0.00118	-	-	-
S4	0.63652	0.13241	0.33182	0.25076	0.00099	0.11319	0.00635	-	-
S5	0.6598	0.1459	0.4798	0.32659	0.00118	0.2224	0.02544	1	-
Shannon	G1	G2	G3	G4	S1	S2	S3	S4	S5
G2	0.18481	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	0.40396	0.00666	-	-	-	-	-	-	-
G4	0.68157	0.24982	0.12849	-	-	-	-	-	-
S1	0.00074	0.00313	0.00074	0.00169	-	-	-	-	-
S2	0.83809	0.16078	0.53516	0.68157	0.00074	-	-	-	-
S3	0.24982	0.60757	0.00222	0.24982	0.00074	0.24982	-	-	-
S4	0.48975	0.60757	0.09441	0.73415	0.00099	0.32614	0.86331	-	-
S5	0.58171	0.24982	0.04645	0.83809	0.00099	0.48975	0.40396	0.65484	-

Tabla suplementaria S4.- Miembros de la comunidad procarionte compartidos según distancia a la pingüinera.

Punta										
Taxonomía/prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	6	12	12	14	16	19	19	21	23	25
Clase	5	12	20	26	31	37	40	46	52	57
Orden	5	11	26	40	53	62	67	79	96	106
Familia	2	9	30	47	63	74	85	98	138	149
Genero	1	7	23	45	64	81	96	117	158	177
Especie	1	4	12	29	44	59	68	84	112	125
ASV	0	1	4	23	44	99	160	264	521	595
COLL										
Taxonomía/prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	9	11	13	15	16	16	18	20	21	22
Clase	16	24	28	33	36	39	42	46	52	57
Orden	17	34	41	48	54	60	73	79	91	96
Familia	16	38	47	52	62	70	90	100	117	122
Genero	15	33	52	63	73	85	106	122	146	156
Especie	7	21	34	45	52	61	75	91	111	119
ASV	5	16	49	71	111	172	251	336	490	541

Tabla suplementaria S5.- Miembros de la comunidad procarionte compartidos entre los sitios PUNTA.

PUNTA-A										
Taxonomía/Prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	8	9	9	11	12	13	13	14	14	15
Clase	7	7	9	12	14	16	16	16	18	20
Orden	8	8	11	15	20	23	23	32	38	41
Familia	7	7	10	16	22	28	28	40	48	53
Genero	7	7	10	17	21	27	27	38	48	51
Especie	3	3	4	5	8	11	11	17	26	27
ASV	14	14	18	30	40	49	49	70	88	106

PUNTA-SU										
Taxonomía/Prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	16	16	18	19	21	22	22	23	24	24
Clase	30	30	36	40	44	45	48	49	52	52
Orden	44	44	55	63	73	78	85	90	95	99
Familia	50	50	66	79	91	97	111	124	132	138
Genero	47	47	66	86	103	111	128	144	155	165
Especie	33	33	51	61	72	79	96	106	113	120
ASV	38	38	86	140	202	270	366	443	501	555

PUNTA-PA										
Taxonomía/Prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	10	10	12	14	14	16	19	19	20	23
Clase	18	18	23	26	28	34	38	41	47	52
Orden	24	24	38	46	49	58	70	77	85	96
Familia	31	31	49	59	61	73	85	97	111	129
Genero	31	31	52	67	70	83	99	109	129	155
Especie	19	19	33	42	47	59	72	82	96	117
ASV	25	25	44	70	95	140	196	263	364	486

PUNTA-SU-BS										
Taxonomía/Prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	14	14	18	18	19	20	21	23	24	25
Clase	24	24	31	36	38	43	45	50	52	56
Orden	35	35	48	57	59	72	78	85	96	103
Familia	40	40	57	67	75	87	98	114	132	144
Genero	40	40	57	69	81	99	112	130	150	170
Especie	27	27	42	51	60	72	81	96	109	122
ASV	22	22	49	87	134	204	271	389	497	585

PUNTA-PA-BS										
Taxonomía/Prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	13	13	15	15	18	18	20	22	26	26
Clase	21	21	23	28	34	39	46	53	63	65
Orden	26	26	35	45	54	64	75	88	107	117
Familia	29	29	41	53	68	80	94	110	136	155
Genero	26	26	38	52	73	90	110	135	165	191
Especie	15	15	24	37	73	68	81	99	120	144
ASV	9	9	21	32	80	152	233	357	533	722

Tabla suplementaria S6.- Miembros de la comunidad procarionte compartidos entre los sitios COLL.

COLL-BS1										
Taxonomía/Prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	10	10	11	14	16	18	19	20	21	22
Clase	23	23	27	30	35	39	45	47	50	55
Orden	31	31	39	47	54	63	69	79	85	94
Familia	35	35	42	57	66	73	81	95	106	122
Genero	33	33	46	63	74	87	102	119	140	159
Especie	18	18	31	44	53	65	72	88	104	122
ASV	25	25	47	80	126	177	250	339	431	543

COLL-BS2										
Taxonomía/Prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	9	9	12	13	15	16	17	19	20	22
Clase	16	16	23	31	35	38	42	47	51	56
Orden	20	20	33	41	50	57	66	77	88	97
Familia	20	20	39	49	57	67	77	93	111	124
Genero	20	20	39	49	67	80	88	113	137	157
Especie	11	11	25	29	42	60	67	84	103	117
ASV	14	14	31	52	88	150	218	310	421	522

COLL-BS3										
Taxonomía/Prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	13	13	15	17	17	17	17	19	20	22
Clase	29	29	33	37	39	40	43	49	52	56
Orden	41	41	47	56	62	70	73	86	90	98
Familia	46	46	57	65	74	83	93	107	114	123
Genero	53	53	70	83	91	107	116	133	141	155
Especie	39	39	48	56	65	76	83	97	104	114
ASV	63	63	107	158	202	262	326	399	458	531

COLL-BS4										
Taxonomía/Prevalencia	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
Phylum	12	12	14	14	14	15	15	18	19	22
Clase	23	23	29	31	36	38	38	44	48	55
Orden	34	34	45	51	59	65	65	73	79	96
Familia	37	37	50	59	72	82	82	94	106	122
Genero	37	37	53	66	82	91	91	114	133	155
Especie	25	25	35	46	62	68	68	82	101	118
ASV	31	31	69	105	156	220	220	326	410	513

Tabla suplementaria S7: PERMANOVA a análisis de distancia UniFrac ponderado

A)

Number of permutations:999
Terms added sequentially (first to last)

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F. Model	R2	Pr(>F)
sample_data(Phyloseq_obj)\$Group	8	8.8875	1.11093	11.506	0.56804	0.001 ***
Residuals	70	6.7585	0.09655		0.43196	
Total	78	15.6459				1

Signif.codes: 0 '****' 0.01 '***' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

B)

Number of permutations:999
Terms added sequentially (first to last)

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F. Model	R2	Pr(>F)
sample_data(Phyloseq_obj)\$Group	4	3.7444	0.93359	6.8516	0.40659	0.001 ***
Residuals	40	5.4503	0.13626		0.59341	
Total	44	9.1847				1

Signif.codes: 0 '****' 0.01 '***' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

C)

Number of permutations:999
Terms added sequentially (first to last)

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F. Model	R2	Pr(>F)
sample_data(Phyloseq_obj)\$Group	3	1.2673	0.42245	2.1238	0.17049	0.001 ***
Residuals	31	6.1663	0.19891		0.82951	
Total	34	7.4336				1

Signif.codes: 0 '****' 0.01 '***' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

La tabla A, corresponde al análisis de PERMANOVA realizado a la matriz generada en la figura 10A (todos los sitios). La tabla B, corresponde al análisis de PERMANOVA realizado a la matriz generada en la figura 10B (sólo sitios PUNTA). La tabla C, corresponde al análisis de PERMANOVA realizado a la matriz generada en la figura 10C (sólo sitios COLL).

Tabla suplementaria S8.- Identificación de secuencias (ASVs y mejores hits en Blastp) según posicionamiento y taxonomía con respecto a árbol de referencia

Secuencia	like_weight_ratio	Posicionamiento	Taxonomia Clado
be226-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814	Amarillo 1	Nostocales
AAT77213.1_uncultured_bacterium	0.991736662		
AAT77216.1_uncultured_bacterium	0.991733732		
ea711-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814		
63527-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814		
3db9f-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814		
cf047-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814		
AAT77212.1_uncultured_bacterium	0.991788405		
a032c-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.974051617		
AAT77217.1_uncultured_bacterium	0.990821841		
AAS86753.1_uncultured_bacterium	0.999485981		
AAT48911.1_uncultured_bacterium	0.999640812		
ALL25732.1_uncultured_bacterium	0.999359668		
9d8d9-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.974051617		
AEE87229.1_uncultured_nitrogen-fixing_bacterium	0.982860023		
AEE87229.1_uncultured_nitrogen-fixing_bacterium	0.982860023		
ALB34923.1_uncultured_bacterium	0.9996794		
AAT77219.1_uncultured_bacterium	0.992166045		
AAT35825.1_uncultured_bacterium	0.974400963		
AAU14749.1_uncultured_bacterium	0.999642965		
4ce22-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814		
8fd47-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814		
6b1de-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814		
1020e-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814		
0bcd9-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.950516814		
AAT77211.1_uncultured_bacterium	0.991782427		
AAT48912.1_uncultured_bacterium	0.999380735		
ALB34978.1_uncultured_bacterium	0.999649414		
Secuencia	like_weight_ratio	Posicionamiento	Taxonomia Clado
9f84e-UEDA_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.741399882	Celeste 1	Frankiales
3c79f-UEDA_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.690581138		
AXB87549.1_uncultured_bacterium	0.998457037		
AXB87574.1_uncultured_bacterium	0.978787252		
AXB87559.1_uncultured_bacterium	0.992610812		
AXB87574.1_uncultured_bacterium	0.978787252		
AXB87549.1_uncultured_bacterium	0.998457037		
AXB87571.1_uncultured_bacterium	0.970082614		
AXB87571.1_uncultured_bacterium	0.970082614		
AXB87543.1_uncultured_bacterium	0.994514861		
AXB87559.1_uncultured_bacterium	0.992610812		
AXB87573.1_uncultured_bacterium	0.996529941		
AXB87573.1_uncultured_bacterium	0.996529941		
AXB87543.1_uncultured_bacterium	0.994514861		
AXB87552.1_uncultured_bacterium	0.793582529		
AXB87574.1_uncultured_bacterium	0.978787252		
ALB34977.1_uncultured_bacterium	0.463937865		
AXB87573.1_uncultured_bacterium	0.996529941		
AXB87548.1_uncultured_bacterium	0.999396215		
AXB87548.1_uncultured_bacterium	0.999396215		

Secuencia	like_weight_ratio	Posicionamiento	Taxonomia Clado
f5bfd-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.361527174	Amarillo 2	Burkholderiales
AEB96941.1_uncultured_bacterium	0.873980847		
8280e-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.441385997		
ARA13719.1_uncultured_bacterium	0.205867372		
167bf-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.361527174		
ABG80881.1_uncultured_soil_bacterium	0.342669092		
AEE87228.1_uncultured_nitrogen-fixing_bacterium	0.996330669		
CAC85903.1_uncultured_bacterium	0.996286162		
AAZ06669.1_uncultured_nitrogen-fixing_bacterium	0.994873744		
AAO67608.1_uncultured_bacterium	0.996267131		

Secuencia	like_weight_ratio	Posicionamiento	Taxonomia Clado
AEE87232.1_uncultured_nitrogen-fixing_bacterium	0.218767877	Amarillo 3	Burkholderiales
c2098-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.173290178		
AZM69044.1_uncultured_bacterium	0.337068941		
AAT48916.1_uncultured_bacterium	0.337404469		
ACI14144.1_uncultured_bacterium	0.232162433		
AGI96629.1_uncultured_Sinorhizobium_sp.	0.337966291		
08e5f-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.173290178		
c5b22-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.173290178		

Secuencia	like_weight_ratio	Posicionamiento	Taxonomia Clado
WP_123927773.1_Thermodesulfotimonas_autotrophica	0.995436354	Celeste 2	No asignado
52892-UEDA_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.777235422		
AEG16830.1_Desulfofundulus_kuznetsovii_DSM_6115	0.99586974		
WP_088554943.1_Calderihabitans_maritimus	0.99613298		
WP_075859892.1_Carboxydotherrmus_pertinax	0.996798352		
WP_141263915.1_Moorella_sp._E308F	0.995998555		
WP_109206336.1_Moorella_sp._Hama-1	0.996604566		
WP_071521047.1_Moorella_thermoacetica	0.996102492		
AHL69121.1_uncultured_bacterium	0.66334105		
WP_054936574.1_Moorella	0.994630309		
WP_141304474.1_Moorella_sp._E306M	0.996000808		

Secuencia	like_weight_ratio	Posicionamiento	Taxonomia Clado
cffe8-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.856067317	Amarillo 4	Clostridiales
ABU86436.1_uncultured_bacterium	0.873305998		
ASN77778.1_uncultured_bacterium	0.832467097		
ABU86471.1_uncultured_bacterium	0.873128277		
ABU86473.1_uncultured_bacterium	0.857235115		
2e747-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.856067317		
b85ee-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.856067317		

Secuencia	like_weight_ratio	Posicionamiento	Taxonomia Clado
ACC95184.1_uncultured_bacterium	0.170192738	Amarillo 5	Clostridiales
bc636-POL_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.201301357		
ACK43210.1_uncultured_Antarctic_bacterium	0.223090667		

Secuencia	like_weight_ratio	Posicionamiento	Taxonomia Clado
AAF60984.1_Acetobacterium_woodii_DSM_1030	0.611616989	Celeste 3	Clostridiales
af972-UEDA_PRIMERS (PUNTA_PA)	0.472477803		
WP_050740289.1_Acetobacterium_bakii	0.765890855		
WP_186842496.1_Acetobacterium_fimetarium	0.968651486		

Tabla suplementaria S9.- Identidad y abundancia de microorganismos que presentan genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno a través de predicciones metagenómicas por medio de PICRUST2

Process	Gene	Taxonomic rank: Order	PUNTA-BS-									
			PUNTA-A	PUNTA-SU	PUNTA-PA	SU	PA	COLL-BS1	COLL-BS2	COLL-BS3	COLL-BS4	
Dissimilatory nitrate reduction	<i>narI-narV</i>	Micrococcales	0.72%	2.77%	3.95%	1.64%	0.30%	0.30%	0.30%	1.12%	0.90%	
		Betaproteobacteriales	0.63%	0.93%	1.86%	0.89%	1.44%	0.68%	1.66%	1.04%	2.64%	
	<i>nirB</i>	Chitinophagales	13.76%	10.27%	10.38%	9.52%	8.59%	6.57%	5.25%	6.87%	4.70%	
		Betaproteobacteriales	1.91%	5.38%	8.56%	4.77%	5.35%	4.96%	5.89%	4.85%	6.55%	
	<i>nirD</i>	Chitinophagales	13.76%	10.27%	10.38%	9.52%	8.59%	6.57%	5.25%	6.87%	4.70%	
		Betaproteobacteriales	1.91%	5.38%	8.56%	4.77%	5.35%	4.96%	5.89%	4.85%	6.55%	
	<i>nrfA</i>	Sphingobacteriales	0.14%	2.57%	0.66%	1.82%	0.99%	0.25%	0.13%	0.15%	0.14%	
		Bacteroidales	0.32%	0.10%	0.07%	0.10%	0.00%	0.00%	0.01%	0.21%	0.01%	
	<i>nrfH</i>	Sphingobacteriales	0.14%	2.57%	0.66%	1.82%	0.99%	0.25%	0.13%	0.15%	0.14%	
		Bacteroidales	0.32%	0.10%	0.07%	0.10%	0.00%	0.00%	0.01%	0.21%	0.01%	
Assimilatory nitrate reduction	<i>narB</i>	Chitinophagales	13.76%	10.27%	10.38%	9.52%	8.59%	6.57%	5.24%	6.87%	4.70%	
		Nostocales	0.28%	0.00%	0.00%	0.07%	0.28%	0.03%	0.01%	0.89%	0.00%	
	<i>nasA</i>	Betaproteobacteriales	1.73%	4.97%	7.91%	4.59%	4.92%	4.24%	5.17%	4.29%	5.78%	
		Micrococcales	1.54%	2.59%	2.80%	1.55%	1.13%	0.61%	0.96%	1.15%	2.17%	
	<i>nasB</i>	Micrococcales	1.54%	2.59%	2.80%	1.55%	1.13%	0.61%	0.96%	1.15%	2.17%	
		Propionibacteriales	0.06%	0.02%	0.04%	0.05%	0.25%	1.68%	1.92%	1.68%	2.61%	
	<i>nirA</i>	Acidobacteriales	3.18%	1.06%	0.37%	0.87%	0.57%	0.04%	0.07%	0.04%	0.03%	
		Nostocales	0.28%	0.00%	0.00%	0.07%	0.28%	0.03%	0.01%	0.89%	0.00%	
	Denitrification	<i>napA</i>	Betaproteobacteriales	0.29%	0.35%	0.35%	0.15%	0.06%	0.19%	0.18%	0.24%	0.20%
			Xanthomonadales	0.24%	0.00%	0.00%	0.03%	0.11%	0.12%	0.06%	0.05%	0.06%
Ga0077536			0.00%	0.00%	0.16%	0.01%	0.02%	0.07%	0.07%	0.04%	0.06%	
<i>napB</i>		Betaproteobacteriales	0.29%	0.35%	0.35%	0.15%	0.06%	0.19%	0.18%	0.24%	0.20%	
		Xanthomonadales	0.24%	0.00%	0.00%	0.03%	0.11%	0.12%	0.06%	0.05%	0.06%	
		Ga0077536	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.06%	0.07%	0.04%	0.06%	
<i>OPB56</i>		OPB56	0.00%	0.10%	0.07%	0.13%	0.12%	0.01%	0.01%	0.01%	0.00%	
		<i>narG-narZ-nxrA</i>	Betaproteobacteriales	0.60%	0.89%	1.86%	0.86%	1.36%	0.66%	1.56%	0.93%	2.60%
			Nitrospirales	0.00%	0.48%	0.25%	0.53%	1.23%	1.66%	1.93%	1.30%	1.92%
Micrococcales			0.72%	2.77%	3.95%	1.64%	0.30%	0.30%	0.29%	1.12%	0.83%	
<i>narH-narY-nxrB</i>	Betaproteobacteriales	0.63%	0.93%	1.86%	0.89%	1.44%	0.68%	1.66%	1.04%	2.64%		
	Nitrospirales	0.00%	0.48%	0.25%	0.53%	1.23%	1.66%	1.93%	1.30%	1.92%		
	Micrococcales	0.72%	2.77%	3.95%	1.64%	0.30%	0.30%	0.29%	1.12%	0.83%		
<i>nirK</i>	Xanthomonadales	27.20%	0.62%	0.42%	1.30%	1.35%	2.09%	0.87%	0.82%	0.67%		
	Gemmatimonadales	1.45%	6.35%	4.28%	9.09%	9.57%	7.06%	9.98%	4.91%	6.13%		
	Nitrospirales	0.00%	0.48%	0.25%	0.53%	1.23%	1.65%	1.93%	1.86%	1.91%		
<i>nirS</i>	Pseudomonadales	0.01%	0.00%	0.05%	0.03%	0.44%	0.09%	0.03%	0.10%	0.11%		
	Betaproteobacteriales	0.05%	0.06%	0.13%	0.03%	0.11%	0.62%	0.30%	0.19%	0.43%		
<i>norB</i>	Xanthomonadales	31.57%	1.01%	0.68%	1.72%	1.74%	2.16%	0.98%	1.01%	0.80%		
	Betaproteobacteriales	0.78%	1.15%	2.08%	1.01%	1.36%	0.66%	1.55%	1.04%	2.66%		
<i>norC</i>	Pseudomonadales	0.01%	0.00%	0.05%	0.03%	0.44%	0.09%	0.03%	0.10%	0.11%		
	Clostridiales	0.00%	0.46%	0.33%	0.38%	0.03%	0.00%	0.15%	0.29%	0.09%		
<i>nosZ</i>	Gemmatimonadales	1.45%	6.35%	4.28%	9.09%	9.57%	7.06%	9.98%	4.91%	6.13%		
	Chitinophagales	15.09%	10.17%	9.21%	9.38%	8.64%	6.84%	5.31%	7.52%	6.11%		
	<i>pmoA-amoA</i>	Methylococcales	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.58%	0.15%	0.85%	0.20%	0.08%	
Betaproteobacteriales		0.74%	0.35%	0.33%	0.33%	0.18%	0.05%	0.02%	0.01%	0.21%		
Nitrososphaerales		0.00%	0.02%	0.02%	0.05%	0.05%	0.97%	0.47%	0.70%	0.77%		
<i>pmoB-amoB</i>	Rhizobiales	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%		
	Methylococcales	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.58%	0.15%	0.85%	0.20%	0.08%		
	Betaproteobacteriales	0.74%	0.35%	0.33%	0.33%	0.18%	0.05%	0.02%	0.01%	0.21%		
<i>pmoC-amoC</i>	Nitrososphaerales	0.00%	0.02%	0.02%	0.05%	0.05%	0.97%	0.47%	0.70%	0.77%		
	Rhizobiales	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%		
	Methylococcales	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.58%	0.15%	0.85%	0.20%	0.08%		
<i>hao</i>	Betaproteobacteriales	0.74%	0.35%	0.33%	0.33%	0.18%	0.05%	0.02%	0.01%	0.21%		

Abundancia relativa
+ %
- %

Tabla suplementaria S10.- Resultados ANOVA para la significancia estadísticas de las variables fisicoquímicas que impactan la comunidad procarionte en el modelo construido mediante ordistep.

Variable	Df	ChiSquare	F	Pr(>F)	Significancia
TDP	1	0.8889	3.5786	0.001	***
NO3	1	0.7775	3.1301	0.001	***
P	1	0.3831	1.5422	0.01	**
TP	1	0.3837	1.5448	0.008	**
NH4	1	0.3185	1.2821	0.05	*
Residual	21	5.2161			