

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE AGUA SOBRE LA DIVERSIDAD DE
BACTERIAS OXIDADORAS DE AMONIO DE SUELOS ÁRIDOS”**

Seminario de Título
entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

por

Mauricio Eduardo Bustamante Flores

Enero, 2010
Santiago - Chile

Directora de Seminario de Título: Dra. Margarita Carú Marambio



**“EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE AGUA
SOBRE LA DIVERSIDAD DE
BACTERIAS OXIDADORAS DE AMONIO DE SUELOS ÁRIDOS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MAURICIO EDUARDO BUSTAMANTE FLORES

Dra. Margarita Carú Marambio
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de la Dra. Margarita Carú Marambio, sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora

Dr. Francisco Chávez Espinosa
Presidente

Firma manuscrita en azul del Dr. Francisco Chávez Espinosa, sobre una línea horizontal.

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Corrector

A mi gran familia...

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por darme la vida, han sido el pilar de mi existencia, por todo su amor incondicional, paciencia y coraje. A mi madre por su entrega y dedicación, a mi padre por ser mi modelo a seguir, también por los tarros de barniz.

A mis preciosos hermanos, por estar siempre cuando los necesito y cuando no también, hemos sido afortunados de ser parte de esta familia. Mi hermanita la topísima obvio y mi hermano el deportista. No puedo olvidar a mi hermano Nacho el arquero.

A mis abuelos que siempre me han apoyado desde aquí o desde el cielo.

A mis tíos y tías, cada uno con su cuento.

A mis primos y primas, aquí sí que hay gente, por los partidos de baby, las celebraciones de cumpleaños y todo lo vivido juntos.

A las maravillosas personas que he conocido en el laboratorio de Ecología Microbiana, empezando por la profe Margarita, la July, el Rafa, la Juanita, la Feña, la Cata, la Naty, la Vale, la Marisol, el Felipe, el Gabriel, el José. Porque hemos comido delicioso siempre y por ser un equipo de trabajo muy acogedor. Además tenemos la mejor hinchada.

A mis compañeros de carrera, especialmente a los más cercanos con quienes compartimos montón "LOS WASHALINES". A Felipe por su perseverancia y críticas destructivas, a Néstor porque llevamos como mil años siendo compañeros y he visto su metamorfosis, a Andrés por sus ideas de política social y monetaria, al Vicho porque es como mi hermano mayor (es más viejo que yo) y no me olvido del actor invitado, don Josué Lagos, un gran amigo.

A una persona muy especial que quiero muchísimo, la Cami, por su fuerza y empuje, porque tiene el corazón más grande que conozco y me ha enseñado muchas cosas realmente importantes de la vida.

Y finalmente al proyecto FONDECYT 1080280 por el apoyo económico para la realización de este Seminario de título.



RESUMEN BIOGRÁFICO

El día 30 de Septiembre del año 1984 nací en Santiago, trayendo alegría y representando un gran desafío para mis jóvenes e inexpertos padres. Desde pequeño acaparé la atención de mis dos grandes familias, los Flores y los Bustamante, quienes inculcaron en mí un profundo amor por mi país y mis raíces, enseñándome que el trabajo siempre dignifica al hombre. Comencé muy pequeño mis estudios en el jardín Los Pitufos, pasando luego al colegio Abraham Lincoln y posteriormente al Liceo Miguel de Cervantes y Saavedra, en donde desarrollé habilidades para el estudio que prontamente fueron reconocidas y potenciadas. Gracias a lo anterior pude acceder al Instituto Nacional, el colegio con más tradición de nuestro país, lo que aportó a mi visión crítica de la sociedad y alimentó mis sueños. En esta etapa me desarrollé íntegramente tanto en el ámbito académico como personal, despertando en mí un gran interés por la biología y en cómo la ciencia podía aportar al desarrollo de mi país. El año 2002 culminé la Enseñanza Media cumpliendo mis primeros sueños al conseguir ingresar a la Universidad de Chile, la universidad más prestigiosa, obteniendo una beca para estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular, una apuesta arriesgada e interesante por el desafío que representaba estar en la vanguardia de la ciencia en un camino poco tradicional. Con los años el tamaño de mis sueños también ha crecido y el camino no ha estado exento de dificultades, pero como aprendí en el colegio y puse en práctica en el Laboratorio de Ecología Microbiana, lugar en que realicé la etapa cúlmine de mi pregrado, "Labor omnia vincit".

ÍNDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	8
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. Origen de las muestras para la construcción del microcosmos	10
2.2. Diseño y Montaje de los Microcosmos	12
2.3. Determinaciones Físico-Químicas	12
2.3.1. Contenido hídrico	12
2.3.2. Materia orgánica	13
2.3.3. Contenido de nitrato y amonio	13
2.3.4. pH y potencial de óxido-reducción	14
2.3.5. Análisis de los datos	14
2.4. Diversidad Genética	14
2.4.1. Extracción del DNA	14

2.4.2. Resolución por T-RFLP del gen ribosomal 16S de β -proteobacterias	15
2.4.3. Normalización y análisis de los perfiles de T-RFLP	17
2.4.4. Relación entre la diversidad genética y los factores edáficos	18
2.5. Diversidad Metabólica	19
2.5.1. Perfiles fisiológicos a nivel de la comunidad (CLPP)	19
2.5.2. Estimación de la diversidad metabólica de la comunidad	20
2.5.3. Relación entre la diversidad metabólica y los factores edáficos	21
3. RESULTADOS	22
3.1. Diseño de los microcosmos	22
3.2. Evaluación del efecto del agua sobre los parámetros edáficos y la capacidad de nitrificación de la microbiota	22
3.3. Evaluación del efecto del agua sobre la diversidad de las bacterias oxidadoras del amonio β AOB	27
3.3.1. Extracción del DNA desde muestras de suelo	27
3.3.2. Amplificación del gen del rRNA 16S de las β -proteobacterias	28
3.3.3. Perfiles de T-RFLP	30
3.4. Evaluación del efecto del agua sobre la diversidad metabólica de la comunidad microbiana	37
4. DISCUSIÓN	45
4.1. Evaluación del efecto del agua sobre los parámetros edáficos y la capacidad de nitrificación de la microbiota	46
4.2. Efecto del agua sobre la diversidad de las bacterias oxidadoras del amonio	49
4.3. Efecto del agua sobre la respuesta metabólica de la comunidad	51

5. CONCLUSIONES	53
6. REFERENCIAS	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Partidores usados para la amplificación del gen del rRNA 16S.	16
Tabla 2	Correlaciones de Pearson entre los parámetros edáficos de los microcosmos del suelo semiárido.	26
Tabla 3	Correlaciones de Pearson entre los parámetros edáficos de los microcosmos del suelo Árido.	27
Tabla 4	Asociación de T-RFs obtenidos para el gen del rRNA 16S de β AOB a géneros de oxidadores de amonio con el programa MICA.	33
Tabla 5	Coefficientes canónicos y de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los T-RFs, en los microcosmos de los suelos árido y semiárido.	36
Tabla 6	Parámetros de diversidad estimados mediante perfiles de T-RFLP del gen del rRNA 16S β AMO de los suelos árido y semiárido.	37
Tabla 7	Coefficientes canónicos y de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los ejes 1 y 2 del ordenamiento de los CLPP, en los microcosmos de los suelos árido y semiárido.	42
Tabla 8	Proporción de las fuentes de carbono utilizadas separadas por categorías.	43
Tabla 9	Parámetros de diversidad metabólica estimados para la comunidad microbiana de los suelo árido y semiárido a partir de las fuentes de carbono utilizadas en el ensayo de CLPP.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema del proceso de nitrificación.	3
Figura 2	Catabolismo de la oxidación del amonio.	5
Figura 3	Ubicación geográfica de la localidad de "El Romeral", lugar de origen de las muestras del suelo semiárido correspondiente al matorral esclerófilo de Chile Central.	11
Figura 4	Ubicación geográfica de la localidad de "Sierra Pajarito", lugar de origen de las muestras del suelo árido correspondiente al matorral subdesértico del Desierto de Atacama.	11
Figura 5	Potencial de óxido reducción (ORP) y contenido hídrico (CH) determinados durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto).	23
Figura 6	Contenido de materia orgánica (MO) y pH determinados durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto).	24
Figura 7	Contenido de amonio ($\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{PS}}^{-1}$) y contenido de nitrato ($\mu\text{g N-NO}_3^- \text{ g}_{\text{PS}}^{-1}$) determinados durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto).	25
Figura 8	Electroforesis del DNA genómico en un gel de agarosa al 0,8%.	28
Figura 9	Electroforesis de los amplicones del gen del rRNA 16S usando los partidores fD1 y rP2 en un gel de agarosa al 1,2%.	29
Figura 10	Electroforesis de los productos de la segunda amplificación del gen del rRNA 16S específico para β proteobacterias usando los partidores β -AMOf y β -AMOr en un gel de agarosa al 1,2%.	29
Figura 11	Frecuencia relativa de los principales T-RFs obtenidos para el gen del rRNA 16S de β AOB a diferentes tiempos de incubación de los microcosmos del suelo semiárido.	31
Figura 12	Frecuencia relativa de los principales T-RFs obtenidos para el gen del rRNA 16S de β AOB a diferentes tiempos de incubación de los microcosmos del suelo árido.	32
Figura 13	Análisis de agrupamiento del gremio de bacterias oxidadoras de amonio de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto) bajo	

	cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos.	34
Figura 14	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de T-RFLP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto).	35
Figura 15	Curvas de Diversidad Metabólica de las Comunidades (CMD) para cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto).	39
Figura 16	Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto) bajo cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos.	40
Figura 17	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles fisiológicos (CLPP) y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto).	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AOB	Ammonia-oxidizing bacteria (Bacterias oxidadoras de amonio)
CH	Contenido hídrico
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxirribonucleótido trifosfato)
CCA	Canonical Correspondence Analysis (Análisis de correspondencia canónica)
CFU	Colony Forming Unit (Unidad formadora de colonia)
CLPP	Community-Level Physiological Profiling (Perfil fisiológico a nivel comunitario)
CMD	Community Metabolic Diversity (Diversidad metabólica de la comunidad)
D	Suelo árido proveniente del Desierto de Atacama
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilen-diamino-tetracético)
M	Suelo semiárido proveniente del matorral esclerófilo de Chile Central
MO	Materia orgánica
MVSP	Multi-Variate Statistical Package (Paquete de estadística multivariada)
NH ₄ ⁺	Contenido de amonio
NO ₃ ⁻	Contenido de nitrato

ORP	Potencial de óxido-reducción
OTU	Operational Taxonomic Unit (Unidad Taxonómica Operacional)
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline (Buffer fosfato salino)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PS	Peso seco
tH ₂ O	Tratamiento con agua desionizada
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)
T-RF	Terminal Restriction Fragment (Fragmento terminal de restricción)
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UF	Unidades de fluorescencia
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (Método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética)

RESUMEN

Los ciclos de sequía-precipitación son comunes en una variedad de ecosistemas, pero a menudo son más pronunciados en ecosistemas áridos con precipitaciones fuertemente estacionales. La disponibilidad de agua afecta la abundancia, composición y actividad metabólica de la microbiota, además de influir en el ciclado de nutrientes, entre ellos el nitrógeno. Los compuestos intermediarios claves del ciclo del nitrógeno son: el nitrógeno molecular (N_2), el amonio (NH_4^+), y el nitrato (NO_3^-) y los principales grupos funcionales involucrados comprenden a los fijadores de nitrógeno, los nitrificadores y los desnitrificadores. En este trabajo se estudió el efecto de la disponibilidad de agua sobre la diversidad genética de bacterias oxidadoras de amonio (AOB), involucradas en la etapa limitante de la nitrificación, y la diversidad metabólica de la comunidad microbiana, mediante ensayos de microcosmos con suelo semiárido proveniente del matorral esclerófilo (localidad El Romeral, Región Metropolitana) y suelo árido proveniente del Desierto de Atacama (localidad Sierra Pajarito, Región de Atacama). Los microcosmos tratados se regaron con agua cada 14 días hasta alcanzar el 60% de la capacidad de retención de agua del suelo y se incubaron durante 84 días. Durante la incubación, se evaluó el efecto del agua, sobre los parámetros edáficos, la actividad de nitrificación, la diversidad genética de las AOB y la diversidad metabólica de la comunidad microbiana total. Los resultados mostraron que los parámetros edáficos no cambiaron de manera sustancial con la incubación ni el tratamiento aplicado. El pH presentó valores cercanos a la neutralidad en ambos tipos de suelo, siendo levemente más básico en suelo árido, mientras la materia orgánica fue el parámetro con mayores diferencias entre los suelos estudiados, con un

contenido mucho más alto en el suelo semiárido. También se observó un aumento sustancial en la actividad nitrificante durante la incubación de los microcosmos de suelo semiárido y un aumento marginal de esta actividad en suelo árido, tratados con agua. La diversidad genética de las AOB se estudió con el gen del 16S rRNA de Beta-proteobacterias amplificado por PCR y resuelto mediante T-RFLP. El análisis de agrupamiento mostró una separación entre los tipos de suelo, pero no reveló agrupamiento por el tratamiento aplicado. Los factores edáficos que influenciaron los agrupamientos fueron el pH, materia orgánica y amonio. El análisis *in silico* de los T-RFs obtenidos indicó la presencia de *Nitrosomonas* y *Nitrosospira* en ambos suelos. El perfil metabólico de la comunidad microbiana (CLPP) se estudió mediante el uso de Ecoplacas. La diversidad metabólica de la comunidad microbiana, medida como la capacidad de utilizar varias fuentes de carbono, fue diferente entre los suelos estudiados. El análisis de correspondencia canónica entre los perfiles metabólicos y los factores edáficos medidos reveló que las muestras se separaron de acuerdo al tipo de suelo y que los parámetros edáficos que mejor explicaron esta separación fueron nuevamente pH y materia orgánica. En conclusión, el tipo de suelo explicó la diferenciación de las comunidades microbianas a nivel genético y metabólico. La mayor disponibilidad de agua tuvo efecto en el aumento en la actividad nitrificante, pero no modificó la diversidad genética de las AOB ni la diversidad metabólica de la comunidad microbiana de suelos áridos y semiáridos.

ABSTRACT

Cycles of drought-rewetting are common in a variety of ecosystems, but often are more pronounced in arid environments with mainly seasonal rainfall. Water availability affects the abundance, composition and metabolic activity of microbiota, as well as influence the cycling of nutrients, including nitrogen. The key intermediates of the nitrogen cycle are: molecular nitrogen (N_2), ammonium (NH_4^+), and nitrate (NO_3^-); and major microbial functional groups involved are the nitrogen fixers, the nitrifiers and denitrifiers. In this work we have studied the effect of water availability on the genetic diversity of ammonia oxidizing bacteria (AOB), involved in the limiting step of nitrification, and the metabolic diversity of the microbial community, in microcosms with semi-arid soil from the sclerophyllous matorral (El Romeral, Metropolitan Region) and arid soil from the Atacama Desert (Sierra Pajarito, Atacama Region). The microcosms were irrigated with deionized water every 14 days to reach 60% of water holding capacity of each soil and incubated during 84 days. During incubation, we evaluated the effect of water on the soil parameters, the activity of nitrification, the genetic diversity of the AOB and the metabolic diversity of total microbial community. The results showed that the soil parameters did not change significantly with incubation or treatment. The pH values were close to neutrality in both soil types, being a little more basic in arid soil, while the organic matter was the parameter with greater differences between both soils studied, with a much higher content in semiarid soil. There was also a significant increase in nitrifying activity during incubation of semiarid soil microcosms and a marginal increase of this activity in arid soil, treated with water. The genetic diversity of AOB was studied using 16S rRNA gene of Beta-proteobacteria amplified by PCR and

resolved by T-RFLP. Cluster analysis showed a separation of the soil types, but revealed no grouping by treatment. The edaphic factors that influenced the groupings were pH, organic matter and ammonium content. The *in silico* analysis of T-RFs indicated the presence of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* in both soils. The metabolic profile of the microbial community (CLPP) was studied using EcoPlates. The metabolic diversity of the microbial community, measured as the ability to use a set of carbon sources was different between the soils studied. Canonical correspondence analysis between the metabolic profiles and soil factors showed that the samples were separated according to soil type and soil parameters that best explained the separation were again pH and organic matter content. In conclusion, the soil type explained the differentiation of microbial communities at the genetic and metabolic levels. The increased availability of water had effect on the increase in nitrifying activity, but did not alter the genetic diversity of AOB and metabolic diversity of microbial community from arid and semi-arid soils.

1. INTRODUCCIÓN

En los distintos ecosistemas las comunidades microbianas juegan un papel fundamental en la biogeoquímica, debido a su versatilidad metabólica, alto número poblacional y altas tasas de actividades enzimáticas (Atlas y Bartha, 2001). Los procesos microbianos constituyen aproximadamente la mitad de la fotosíntesis, y casi en su totalidad la descomposición de materia orgánica, nitrificación, desnitrificación, producción de metano, entre otros (Schlesinger, 1997).

Los microorganismos actúan a escalas espaciales y temporales reducidas, lo cual supone que las respuestas a las perturbaciones en el ecosistema, podrían ocurrir en tiempos relativamente cortos (Garland, 1997; Prosser y col. 2003). Estas respuestas dependerán de los diversos factores bióticos como la abundancia y diversidad de la microbiota, pero también de los factores abióticos, incluyendo la disponibilidad del agua y los nutrientes como el nitrógeno, entre otros. Algunos de estos factores son limitantes para la productividad de muchos suelos, en especial en los ecosistemas áridos y semiáridos donde se postula que, por su dependencia del régimen de precipitaciones, las comunidades microbianas podrían responder rápidamente a los efectos del cambio climático (OIES, 1991). En Chile las regiones áridas y semiáridas comprenden una superficie aproximada de 16,5 millones de hectáreas, representando cerca del 22% del territorio nacional, entre ellas se encuentran el matorral esclerófilo de Chile Central (suelo semiárido) y el desierto de Atacama (suelo árido) (Gajardo, 1994).

Los ciclos de sequía y precipitación ("drying-rewetting") son comunes en una gran variedad de ecosistemas (Kieft y col. 1987; Groffman y Tiedje, 1988; Ryan y col. 1998; Pulleman y Tietema, 1999), sin embargo sus efectos son más pronunciados en las regiones áridas y semiáridas con un régimen fuertemente estacional (Austin y col. 2004). Durante los periodos de sequía se produce una acumulación de los nutrientes en el sistema y al caer la lluvia, se gatilla un aumento rápido de la actividad metabólica de los microorganismos (Otter y Scholes, 2005), afectando la biomasa (Bottner, 1985; Kieft y col. 1987; van Gestel y col. 1993), la composición microbiana (Drees y col. 2006), la abundancia de la microbiota (Singh y Kashyap, 2006) y el ciclado de los nutrientes (Schimel y Parton, 1986; Peterjohn y Schlesinger, 1991; Gebauer y Ehleringer, 2000; Housman y col. 2006; Singh y Kashyap, 2006). En lugares con baja concentración de carbono se ha observado que el aumento en el contenido hídrico disminuye la diversidad de los microorganismos, se sugiere que el agua favorecería las condiciones de competencia, interrumpiendo el fenómeno de aislamiento espacial al comunicar microhábitats dentro de la matriz del suelo (Zhou y col. 2002).

En los ecosistemas áridos y semiáridos, también hay limitación de los nutrientes, entre ellos el nitrógeno (Hooper y Johnson, 1999; Ehleringer, 2001), el cual requieren los organismos para la síntesis de las proteínas, ácidos nucleicos y amino azúcares. El nitrógeno también está involucrado en una gran variedad de reacciones de oxido-reducción asociadas generalmente con los sistemas de transporte de electrones (Ferguson, 1998). Su reservorio principal es la atmósfera, donde se encuentra en forma de N_2 constituyendo el 79% de los gases, sin embargo, el dinitrógeno no puede ser utilizado por la mayoría de los seres vivos por lo cual su

incorporación a la biosfera es limitante y depende de la actividad de los microorganismos diazotróficos.

Los compuestos intermediarios claves del ciclo del nitrógeno son: el nitrógeno molecular (N_2), el amonio (NH_4^+), y el nitrato (NO_3^-) y los principales grupos funcionales comprenden a los fijadores de nitrógeno, los nitrificadores y los desnitrificadores.

La nitrificación, que consiste en la transformación del amonio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-), ocurre en dos pasos: se inicia con la oxidación del amonio y como resultado se obtiene nitrito (NO_2^-), el cual en un segundo paso es oxidado a nitrato (NO_3^-) (Figura 1). Las bacterias que oxidan amonio (AOB) a nitrito son denominadas con el prefijo *Nitroso*, mientras que las bacterias que oxidan nitrito (NOB) a nitrato se denominan con el prefijo *Nitro*. Estos dos grupos bacterianos actúan de forma secuencial en el proceso de nitrificación (Madigan y col. 1999).

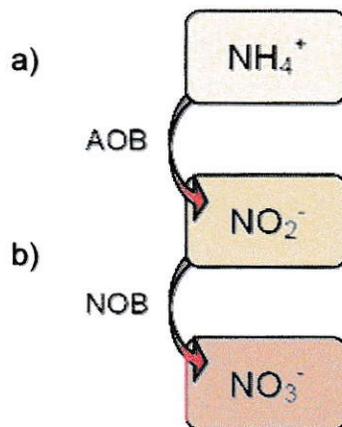


Figura 1: Esquema del proceso de nitrificación. a). Oxidación del amonio a nitrito catalizada por la enzima amonio monooxigenasa de las bacterias oxidadoras de amonio (AOB); b). Oxidación de nitrito a nitrato catalizada por la enzima nitrito reductasa de las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB).

Las AOB se encuentran en la mayoría de los hábitats aeróbicos en donde el amonio está disponible ya sea derivado de fuentes antropogénicas o producido por la mineralización de la materia orgánica, son bacterias ubicuas en el suelo, el agua dulce y los ambientes marinos (Kowalchuk y Stephen, 2001). Estos microorganismos han recibido mayor atención por su papel en la etapa limitante de la nitrificación, la oxidación del amonio (De Boer y Kowalchuk, 2001), permitiendo la movilización del nitrógeno en el suelo al transformar las especies cargadas positivamente (NH_4^+), que se unen preferentemente a las partículas de arcilla con carga contraria, en moléculas de carga negativa (NO_2^- y NO_3^-) capaces de difundir por el suelo (Mendum y col. 1999; Atlas y Bartha, 2001).

Las AOB son microorganismos quimiolitioautótrofos aerobios obligados, aunque algunas especies pueden ser altamente tolerantes a las bajas concentraciones de oxígeno o a los ambientes anóxicos (Bodelier y col. 1996). Utilizan CO_2 como principal fuente de carbono y poseen la habilidad de emplear el amonio como única fuente de energía para su crecimiento (Hooper y col. 1997). De acuerdo a los conocimientos actuales, las características mencionadas requieren de cuatro proteínas especializadas: la amonio monooxigenasa (AMO), la hidroxilamina oxido-reductasa (HAO) y los citocromos c_{554} y c_{M552} (Whittaker y col. 2000; Arp y col. 2002; Hooper y col. 2005). La proteína AMO unida a la membrana inicia el catabolismo con la oxidación del amonio a hidroxilamina, la oxidación subsecuente de hidroxilamina a nitrito es llevada a cabo por la proteína HAO, en el periplasma (Figura 2). Se propone que los electrones extraídos en este proceso de oxidación siguen una cascada redox vía los citocromos c_{554} y c_{M552} hasta la cadena transportadora de electrones a nivel de la ubiquinona (Hooper y col. 1997; Burton y col. 2005).

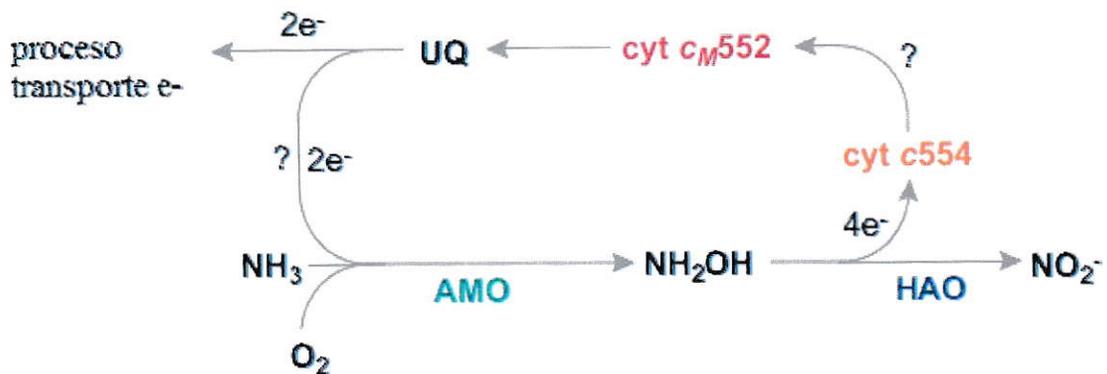


Figura 2: Catabolismo de la oxidación del amonio. AMO, amonio monooxigenasa; HAO, hidroxilamina oxidoreductasa; $\text{cyt } c554$: citocromo $c554$; $\text{cyt } c_{M552}$: citocromo c_{M552} ; UQ: ubiquinona; "?": pasos no verificados experimentalmente. Modificado de Daniel y col. 2007.

Los genes que codifican para las proteínas AMO, HAO y para los citocromos, se presentan en dos o tres copias en las Beta-proteobacterias (Norton y col. 1996; Murrell y col. 2000) y son comunes para todas las AOB (Chain y col. 2003; Klotz y col. 2006).

La enzima clave del proceso es la proteína AMO, y el gen que codifica para su subunidad alfa (el gen *amoA*), se ha utilizado para analizar la composición y diversidad de las comunidades de AOB (Yeager y col. 2005; Bernhard y col. 2005; Chu y col. 2007).

Taxonómicamente las AOB están divididas en 2 grupos monofiléticos basados en las secuencias del gen 16S rRNA (Head y col. 1993; Teske y col. 1994; Purkhold y col. 2000; Purkhold y col. 2003). El primer grupo involucra a las Beta-proteobacterias (β AOB) que contiene a las *Nitrosomonas* (incluyendo *Nitrosococcus mobilis*) y *Nitrospira* (incluyendo especies de *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*). El segundo grupo

pertenece a las Gamma-proteobacterias, al cual corresponden *Nitrosococcus oceani* y *Nitrosococcus halophilus*.

Los estudios ecológicos de las AOB fueron por mucho tiempo impedidos por las dificultades para aislar y cultivar estos microorganismos (Bothe y col. 2000; Kowalchuk y Stephen, 2001). La cuantificación de la riqueza y abundancia, dos parámetros esenciales para definir la estructura y diversidad de una comunidad, se ve seriamente afectada por las limitaciones asociadas a los métodos dependientes de cultivo, considerando que la mayoría de los microorganismos (entre 85% - 99,9%) son aún no cultivados (Torsvik y col. 1990; Barns y col. 1994; Amann y col. 1995). Además, las características del medio de cultivo, ya sean para el aislamiento o el enriquecimiento de muestras ambientales imponen condiciones selectivas que alteran la estructura de la comunidad original (Dunbar y col. 1997, Orlando y col. 2007).

En la actualidad existen diversas estrategias independientes de cultivo, que se basan principalmente en la amplificación por PCR de un marcador molecular como el gen que codifica para el RNA ribosomal 16S (16S rRNA) o genes específicos que definen grupos funcionales. La técnica de T-RFLP (polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal) (Liu y col.. 1997, Marsh y col 1999; Marsh y col. 2000; Rösch y Bothe, 2005), permite la resolución de los amplicones de similar tamaño que difieren en su secuencia, entregando una representación semi-cuantitativa de la distribución de fragmentos terminales de restricción (T-RFs) (riqueza de filotipos) y fluorescencia relativa de cada T-RF (abundancia) (Yeager, 2005).

Aún cuando las técnicas basadas en el DNA han sido las más utilizadas para estimar la diversidad microbiana, estos estudios necesitan otras aproximaciones

metodológicas que permitan conocer por ejemplo el estado funcional de la comunidad microbiana en el estudio (Rosselló-Mora y Kämpfer, 2004, Ramsey y col. 2006). Una forma de abordar este problema es mediante los perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP) (Garland y Mills, 1991), los cuales permiten estimar la diversidad microbiana funcional en términos de las fuentes de carbono que una comunidad puede potencialmente utilizar (diversidad metabólica).

En general la información sobre la diversidad genética y funcional de la microbiota de ecosistemas áridos y semiáridos es escasa, principalmente porque se considera que en estos ecosistemas la abundancia y actividad microbiana es reducida como consecuencia del bajo contenido hídrico. En estos ecosistemas los estudios de la microbiota del suelo se han centrado principalmente en las costras biológicas (Yeager y col. 2004; Nagy y col. 2005; Stursova y col. 2006) y en las comunidades microbianas asociadas a las plantas, las cuales constituyen islas de fertilidad en estos suelos (Waldrop y Firestone 2006; Orlando y col. 2007). Aunque la mayor biomasa microbiana se encuentra en estas islas de fertilidad (Gallardo y Schlesinger, 1992) cuando se comparan con el suelo sin cobertura vegetal, ambas comunidades microbianas son igualmente complejas, aun cuando presentan patrones de diversidad genética distintos (Kuske y col. 2002; Orlando y col. 2007; Farías y col. 2009).

En los suelos desérticos, los valores de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (CFU g⁻¹) para las poblaciones de bacterias aeróbicas pueden variar entre menos de 10 y hasta $1,6 \times 10^7$ dependiendo del tipo de suelo (Bhatnagar y Bhatnagar, 2005). En el suelo del sector de Sierra Pajarito (Desierto de Atacama – Región de Atacama, Chile) se encontraron valores del orden de 10^6 CFU g⁻¹ (Orlando, 2008), en donde se ha detectado la presencia de las bacterias oxidadoras de amonio

pertenecientes a los géneros *Nitrosospira* y *Nitrosolobus* (Orlando, 2008). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en suelos del Desierto de Negev, que muestran que *Nitrosospira* es el principal género de oxidadores de amonio (Nejidat, 2005). En suelos semiáridos de Chile Central, las bacterias cultivables alcanzan valores de 10^7 CFU g^{-1} (Orlando y col. 2007), donde se ha descrito la presencia de los principales grupos funcionales del nitrógeno (Chávez y Carú, 2006; Espinosa, 2007; Orlando y col. 2007, Zúñiga 2008). En el sector de El Romeral (Cajón del Maipo – Región Metropolitana, Chile, el género dominante de bacterias oxidadoras de amonio corresponde a *Nitrosospira* (Espinosa, 2007; Orlando, 2008).

La presencia activa de los gremios bacterianos asociados al ciclo del nitrógeno en estas zonas áridas y semiáridas, sugiere que pueden desempeñar un papel importante en el balance del nitrógeno especialmente bajo condiciones de mayor disponibilidad de agua, durante los períodos de precipitación estacional.

En base a los antecedentes se plantea la siguiente **hipótesis**: “Dado que la disponibilidad de agua es un factor limitante de la actividad microbiana en los suelos áridos, la adición de agua producirá un aumento en la actividad de nitrificación, lo cual podría estar asociado a un cambio en la diversidad genética de la comunidad de las bacterias oxidadoras de amonio”.

Objetivo general:

Evaluar el efecto del agua sobre la estructura genética del gremio de las bacterias nitrificantes, la actividad de nitrificación y los perfiles metabólicos de la microbiota de los suelos áridos provenientes del Desierto de Atacama (Sierra Pajarito) y suelos semiáridos del matorral esclerófilo de Chile Central (El Romeral), mediante ensayos de microcosmos.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto del agua sobre los parámetros edáficos, los contenidos de amonio-nitrato y la actividad nitrificante, durante la incubación de los microcosmos de los suelos áridos y semiáridos.
2. Determinar el efecto de pulsos de agua sobre la riqueza y la abundancia de los filotipos de las bacterias oxidadoras de amonio, mediante patrones del polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal (T-RFLP), durante la incubación de los microcosmos de los suelos áridos y semiáridos.
3. Determinar el efecto del agua sobre la diversidad metabólica potencial de la comunidad microbiana durante la incubación de los microcosmos de suelos áridos y semiáridos, mediante los perfiles fisiológicos a nivel de la comunidad (CLPP).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Origen de las muestras para la construcción del microcosmos

Las muestras fueron colectadas desde:

- La localidad de "El Romeral" (33°48'S, 70°14'W), Cajón del Maipo, Región Metropolitana, Chile. El sitio corresponde a una zona semiárida del matorral esclerófilo de Chile Central que presenta un clima Mediterráneo seco con precipitaciones invernales y un promedio anual de 350 mm (Gajardo, 1994) (Figura 3).
- La localidad de "Sierra Pajarito" (27°59'S, 70°34'W), Desierto de Atacama, Región de Atacama, Chile. En el lugar se presenta un clima desértico árido con escasas precipitaciones las que no superan los 20 mm en promedio, anualmente (McKay y col. 2003) (Figura 4).

Las muestras se obtuvieron del horizonte superficial del suelo. En cada sitio de estudio se tomaron 10 muestras simples de suelo en un área de 10 x 10 m a 10 cm de profundidad, las cuales fueron mezcladas en partes iguales y homogenizadas para la obtención de una muestra compuesta de cada sitio de estudio con el objeto de reducir la heterogeneidad espacial a pequeña escala (Webster y col. 2002; Girvan y col. 2003), y almacenadas a 4°C hasta su utilización.

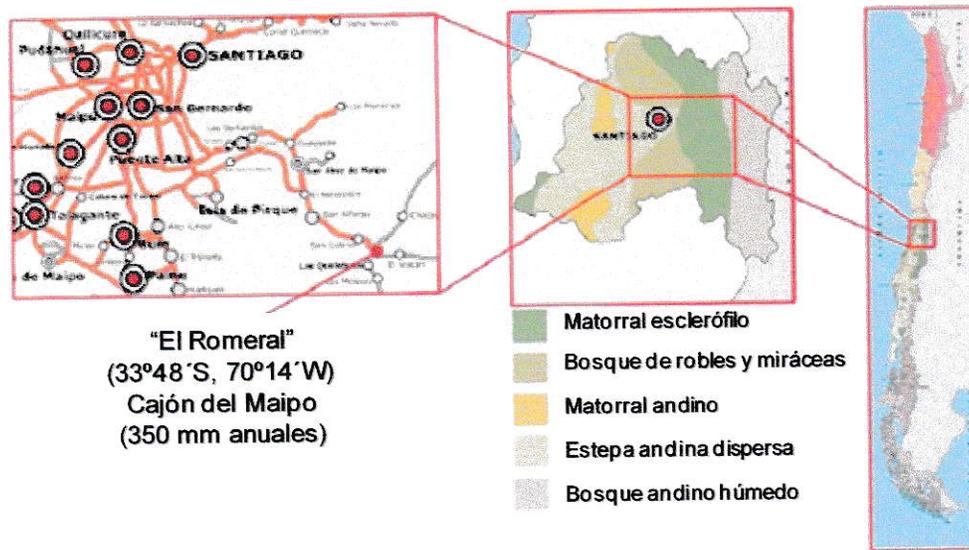


Figura 3: Ubicación geográfica de la localidad de "El Romeral", lugar de origen de las muestras del suelo semiárido correspondiente al matorral esclerófilo de Chile Central.

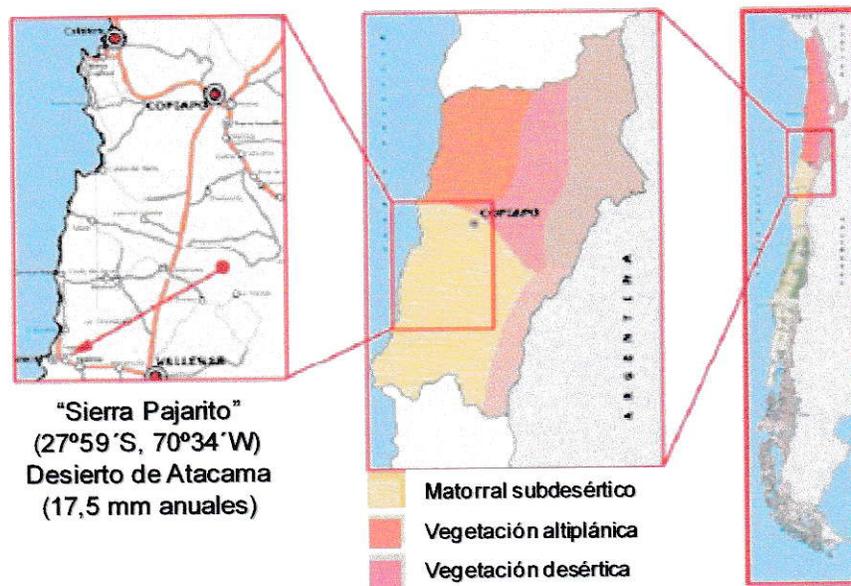


Figura 4: Ubicación geográfica de la localidad de "Sierra Pajarito", lugar de origen de las muestras del suelo árido correspondiente al matorral subdesértico del Desierto de Atacama.

2.2. Diseño y Montaje de los Microcosmos.

A partir de la muestra compuesta de cada sitio [suelo árido del desierto (D) y suelo semi-árido del matorral (M)], se tomaron 150 g de suelo y se prepararon los microcosmos en recipientes plásticos con una relación 1:3 (v:v) suelo:aire y se incubaron a 20°C durante 84 días. El tratamiento (tH₂O) consistió en la aplicación, al inicio de la incubación, de agua desionizada hasta alcanzar el 60% de la capacidad de retención de agua de cada suelo. Cada 14 días se volvieron a regar los suelos para restablecer las condiciones iniciales de humedad. Los microcosmos controles sin riego se denominaron (s/t). Los microcosmos en ambas condiciones, se montaron en triplicado.

Semanalmente (correspondiente a los días 0, 14, 28, 42, 56, 70 y 84) fueron obtenidas submuestras de los microcosmos para las determinaciones físico-químicas. Cada 28 días (0, 28, 56 y 84 días) se tomaron muestras para la determinación de la diversidad genética y a los 0, 42 y 84 días para determinar la diversidad metabólica.

2.3. Determinaciones Físico-Químicas.

2.3.1. Contenido hídrico

El contenido hídrico (CH) del suelo se determinó por gravimetría (Steubing y col. 2002). De cada microcosmos se extrajo 1 g de suelo para determinar el peso húmedo (PH) y luego se secó en estufa a 100°C durante 24 h, para determinar el peso seco (PS). El contenido hídrico (CH) se calculó según la fórmula: $CH = PH-PS/PS*100$.

2.3.2. Materia orgánica

El contenido de materia orgánica (MO) se determinó a partir de las muestras secas utilizadas en la obtención del CH. Para ello las muestras se calcinaron en una mufla a 400°C durante 16 h y se obtuvo el peso del suelo calcinado (PC) (Steubing y col. 2002). El porcentaje de MO fue calculado según la fórmula: $MO = (PS-PC/PC)*0,8$ (Sadzawka y col. 2004).

2.3.3. Contenido de nitrato y amonio

La extracción de nitrógeno mineral se realizó según una modificación del protocolo descrito por Forster (1995). Se agitó 1 g de suelo proveniente de los microcosmos a 150 rpm durante 1 h a temperatura ambiente, con 10 ml de KCl 2 M o con 10 ml de agua desionizada para amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), respectivamente.

Las concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ se determinaron por duplicado mediante métodos colorimétricos descritos por Forster (1995). Para la determinación de NH_4^+ , 100 μ l del extracto en KCl 2 M se mezclaron con 5 ml de reactivo de color (salicilato de sodio 0,3 %, citrato de sodio 2,5 %, tartrato de sodio 2,5 % y 0,12 g de nitroprusiato de sodio en 1000 ml de agua desionizada) y se dejaron reposar 15 min. Se adicionaron a la mezcla 5 ml de solución alcalina de hipoclorito de sodio (NaClO 0,05 % y NaOH 0,75 M) y se dejó reaccionar durante 1 h. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro a 660 nm. -Para la determinación de NO_3^- , a 1 ml del extracto en agua desionizada se agregaron 0,5 ml de solución TRI (salicilato de sodio 1 %, NaCl 0,2 % y sulfamato de amonio 0,1 % en solución de NaOH 0,01 M) y se mezcló totalmente. Se evaporó en estufa a 100°C durante 2 h y se dejó enfriar. Los residuos

se resuspendieron con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Luego de 5 min se agregaron 5 ml de agua desionizada y se dejó reposar hasta que la solución se enfrió. Finalmente se adicionaron 5 ml de NaOH 40% y se realizó la lectura de cada determinación en espectrofotómetro a 410 nm.

2.3.4. pH y potencial de óxido-reducción

El pH y el potencial de óxido-reducción (ORP) se determinaron mediante potenciometría a partir de los extractos en KCl y agua desionizada (Steubing y col. 2002). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.3.5. Análisis de los datos

La correlación entre los parámetros edáficos de los diferentes microcosmos se estableció mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson, utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

2.4. Diversidad Genética

2.4.1. Extracción del DNA

El DNA metagenómico se extrajo a partir de 250 mg de suelo empleando el kit "Ultra Clean Soil DNA" (MoBio Lab, Inc.), según indicaciones del fabricante y se conservó en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8). El DNA obtenido

se visualizó en geles de agarosa al 0.8% en amortiguador TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y almacenado a -20°C .

2.4.2. Resolución por T-RFLP del gen ribosomal 16S de β -proteobacterias

El gen ribosomal del RNA 16S específico para β -proteobacterias fue amplificado mediante una estrategia de PCR anidado. En una primera amplificación, se utilizaron los partidores universales fD1 y rP2 (Weisburg y col. 1991) (tabla 1). La mezcla de reacción (25 μl) contenía GoTaq[®] Green Master Mix (GoTaq[®] DNA Polimerasa en 1X Green GoTaq[®] Reaction Buffer (pH 8,5), 200 μM de cada dNTP y 1,5 mM MgCl_2) (Promega, Madison, WI, USA) y cada uno de los partidores a 0,2 μM . El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguida de 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min, hibridación a 57°C por 30 s y elongación a 72°C por 2 min. Terminando con una extensión final de 7 min a 72°C .

A partir del producto de la primera amplificación, se utilizó 1 μl para la amplificación del gen del rRNA 16S de β -proteobacterias, usando los partidores β -AMOf y β -AMOr (McCaig y col. 1994) (tabla 1) y las mismas condiciones de la mezcla de reacción que para el primer PCR, con la siguiente secuencia de pasos de amplificación: desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 s, hibridación a 57°C por 45 s y extensión a 72°C por 1 min 30 s. El programa finalizó con una extensión a 72°C durante 20 min. Los amplicones para el análisis de T-RFLP fueron generados

empleando el partidor β -AMOf, de la segunda reacción de PCR, marcado en el extremo 5' con FAM (6-carboxyfluoresceína).

La correcta amplificación del DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM) teñidos con bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$). Para determinar el tamaño del fragmento se usó el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Tabla 1. Partidores usados para la amplificación del gen del rRNA 16S.

Partidor	Secuencia (5'-3')*	Tamaño (pb)	Referencia
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1504	Weisburg y col. 1991
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT		
β AMOf	TGGGGRATAACGCAYCGAAAG	1179	McCaig y col. 1994
β AMOr	AGACTCCGATCCGGACTACG		

* R= A ó G; Y= C ó T.

Los productos de PCR marcados con fluorescencia se purificaron mediante el kit Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) y se cuantificaron en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE 1X. Entre 20 y 50 ng del producto de PCR se digirieron independientemente con 20 U de las enzimas de restricción *HaeIII* y *HhaI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 12 h a 37°C, posteriormente las enzimas se inactivaron a 80°C y 65°C por 20 min respectivamente. Los fragmentos de

restricción se separaron por electroforesis capilar en un Analizador Genético ABI PRISM 310 (DNA Facility Iowa State University IOWA, USA)

2.4.3. Normalización y análisis de los perfiles de T-RFLP

El tamaño en pares de bases de los fragmentos terminales de restricción (T-RFs), la altura y el área de los picos en los electroferogramas se determinaron con el programa GeneScan 3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Para el análisis se incluyó sólo aquella fracción del electroferograma comprendida entre los 30 y 500 pb. Se analizaron los T-RFs con una fluorescencia \geq a 30 unidades, ya que se distinguieron claramente de la fluorescencia basal. Los patrones obtenidos de las diferentes muestras, se normalizaron mediante un procedimiento de normalización iterativo (Dunbar y col. 2001), a partir del cual se determinó la fluorescencia relativa de los T-RFs. Adicionalmente los perfiles se alinearon manualmente para evitar la identificación errónea de los T-RFs. Los fragmentos de diferentes longitudes representan distintas unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y no necesariamente especies bacterianas individuales. Por lo tanto la fluorescencia de cada T-RF se utilizó como un indicador de la abundancia relativa de los OTUs identificados en cada muestra. Los datos de las digestiones con dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *HhaI*) se combinaron para los análisis posteriores (Dunbar y col. 2001). A partir de los datos de fluorescencia normalizada de cada T-RF se estimó la diversidad genética de las β AOB asociada con los microcosmos tratados y controles de los diferentes tipos de suelo. Para ello se calculó el índice de Shannon (H') según la fórmula $H = -\sum p_i \ln p_i$ (Begon y col. 1990) donde p_i significa la abundancia relativa de cada T-RF con respecto al total de T-RFs presentes en la muestra. Así también, se

determinó el índice de equidad (J) usando la fórmula $J = H/H_{\text{máx}}$ (Begon y col. 1990) donde: $H_{\text{máx}} = \ln S$, siendo S el número promedio de T-RFs presente en cada muestra. Los cálculos se realizaron con el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK)

Para comparar los perfiles de T-RFLP se utilizó la abundancia relativa de cada OTU, para ello se calculó la distancia Euclídeana (Manly, 1994). El dendrograma se construyó sobre el algoritmo UPGMA (Li 1981) en el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem Blairgowrie, UK).

Para la identificación de los posibles filotipos presentes en la muestra se utilizó el programa de simulación MICA (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>), que busca coincidencias entre la base de datos y los fragmentos terminales obtenidos con el partidador marcado β AMOf.

2.4.4. Relación entre la diversidad genética y los factores edáficos

El Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) es un método multivariado de análisis directo adecuado para describir la relación entre la diversidad genética (T-RFLP) y las variables edáficas (Yang y Crowley, 2000; Yannarell y Triplett, 2005; Morales y col. 2006; Córdova-Kreylos y col. 2006). Sin embargo, para la aplicación de estos análisis es necesario comprobar que las variables medidas no estén fuertemente correlacionadas. Este fenómeno podría afectar el análisis haciendo los coeficientes de correlación muy inestables (Ter Braak, 1990). La posible correlación entre los factores ambientales analizados se evaluó mediante el coeficiente de Pearson según el modelo de regresión lineal usando el programa GraphPad Prism versión 4.0 (GraphPad

Software Inc., San Diego, USA). Posteriormente se realizó el CCA, donde se relacionaron los perfiles de T-RFLP, considerando una matriz de abundancia de los T-RFs, con los parámetros edáficos correspondientes a los suelos de cada tipo. Las variables edáficas fueron: contenido hídrico (CH), materia orgánica (MO), pH, potencial de óxido-reducción (ORP), contenido de nitrato (NO_3^-) y contenido de amonio (NH_4^+). El CCA se realizó en el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK).

2.5. Diversidad metabólica

2.5.1. Perfiles fisiológicos a nivel de la comunidad (CLPP)

La diversidad metabólica potencial de la comunidad microbiana se evaluó utilizando el método BIOLOG mediante EcoPlate™ (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) (Garland, 1997), diseñado para detectar la utilización de 31 fuentes de carbono. Los inóculos para las ecoplacas se prepararon a partir de 1 g de suelo fresco resuspendido en amortiguador PBS 1X estéril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4) y se agitó durante 1 h a 150 rpm. Luego se filtraron las suspensiones con papel filtro para inocular las placas BIOLOG EcoPlate™ con 100 μL del filtrado en cada pocillo, e incubar a 20°C por una semana. El desarrollo de color en los pocillos individuales, que indica la utilización de las fuentes de carbono, fue registrado cada 24 h (Garland, 1997), midiendo la densidad óptica (OD) a 490 nm utilizando un lector de ELISA.

2.5.2. Estimación de la diversidad metabólica de la comunidad

A partir de los perfiles fisiológicos comunitarios (CLPP) se calculó la diversidad metabólica de la comunidad (CMD) de cada muestra, que representa el número de sustratos utilizados por la comunidad microbiana y es análogo a la riqueza metabólica de la comunidad. La CMD se calcula sumando el número de respuestas positivas (pocillos de color púrpura) medidas durante la incubación. El umbral de OD, por sobre el cual la coloración púrpura indica un uso de la fuente de carbono por la comunidad microbiana, se estableció en 0,25 (Garland, 1997). Cada uno de estos parámetros fue graficado durante el tiempo de incubación para obtener una cinética metabólica de la comunidad microbiana. A partir de los datos de OD de cada pocillo se estimó la diversidad metabólica microbiana asociada con los microcosmos tratados y controles de los diferentes tipos de suelo. Para ello se calculó el índice de Shannon (H') según la fórmula $H = -\sum p_i \ln p_i$ (Begon y col. 1990) donde p_i significa la proporción del uso de cada fuente de carbono, respecto al total de las fuentes de carbono usadas como sustrato. Así también, se determinó el índice de equidad (J) usando la fórmula $J = H/H_{\text{máx}}$ (Begon y col. 1990) donde: $H_{\text{máx}} = \ln S$, siendo S el número promedio total de fuentes de carbono que cada comunidad fue capaz de utilizar. Los cálculos se realizaron con el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK). Adicionalmente, con los datos de OD de la lectura en cada pocillo se construyó una matriz para comparar las muestras. Para ello se calculó la distancia Euclideana (Manly, 1994) considerando los valores de OD de cada pocillo. El dendrograma se construyó aplicando el algoritmo UPGMA (Li, 1981) en el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK).

2.5.3. Relación entre la diversidad metabólica y los factores edáficos

Para establecer la correlación entre los patrones de CLPP y los factores edáficos se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA), considerando la matriz de OD de cada pocillo, con los parámetros edáficos correspondientes a los suelos de cada tipo y tratamiento. Las variables edáficas fueron: contenido hídrico (CH), materia orgánica (MO), pH, potencial de óxido-reducción (ORP), contenido de nitrato (NO_3^-) y contenido de amonio (NH_4^+). El CCA se realizó en el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK).

3. RESULTADOS

3.1. Diseño de los microcosmos

Para estudiar el efecto del agua se diseñaron microcosmos con suelo semiárido del matorral esclerófilo de Chile central (M) y con suelo árido del desierto de Atacama (D). Para evaluar el efecto de esta perturbación sobre los parámetros edáficos y la microbiota bacteriana del suelo, se aplicó un tratamiento con agua desionizada cada 14 días durante la incubación de los microcosmos, hasta alcanzar el 60% de la capacidad de retención de agua del suelo. La incubación se realizó durante 84 días a 20°C.

3.2. Evaluación del efecto del agua sobre los parámetros edáficos y la capacidad de nitrificación de la microbiota

Los parámetros edáficos fueron medidos semanalmente durante la incubación de los microcosmos de ambos tipos de suelo. El potencial de óxido-reducción (ORP) indicó condiciones aeróbicas durante todo el ensayo, para ambos suelos, sin diferencias por tratamiento (Figura 6). El contenido hídrico (CH) en los suelos tratados, reflejó el efecto de los riegos (cada 14 días) y presentó una disminución del CH cercana al 5% entre cada tratamiento, el CH inicial se recuperó luego de cada riego. Durante la incubación de los microcosmos controles, sin tratamiento (s/t), el CH disminuyó en el suelo semiárido y se estabilizó hacia el día 14 en un valor cercano al 2,5%, mientras que en el suelo árido, el CH se mantuvo en un valor menor al 1% durante todo el periodo (Figura 5).

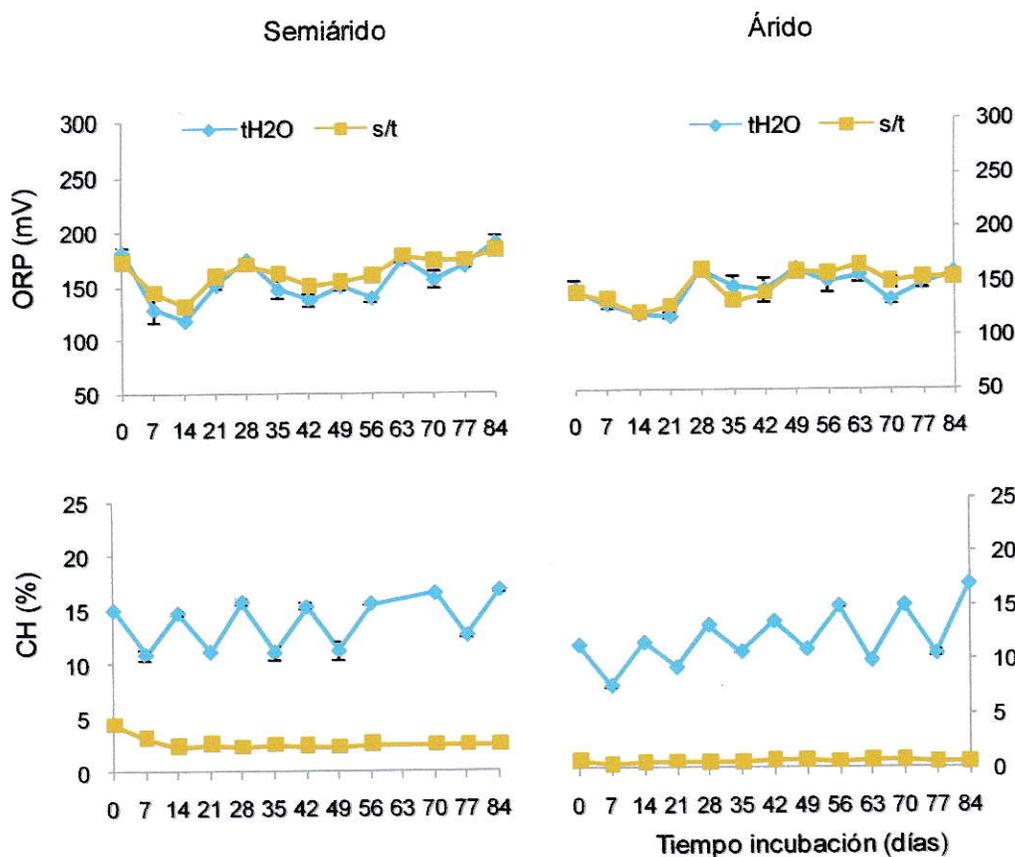


Figura 5. Potencial de óxido reducción (ORP) y contenido hídrico (CH) determinados durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto). Valores promedio \pm EE. Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días (rombos, línea azul); s/t: control sin tratamiento (cuadrados, línea café).

El porcentaje de materia orgánica (MO) y el pH, no presentaron variaciones entre los microcosmos tratados y controles durante el tiempo de incubación. Sin embargo, el suelo semiárido presentó valores de pH levemente inferiores a 7 y un contenido de MO 10 veces mayor que el árido, este último con valores de pH cercanos a 7,5 durante toda la incubación (Figura 6).

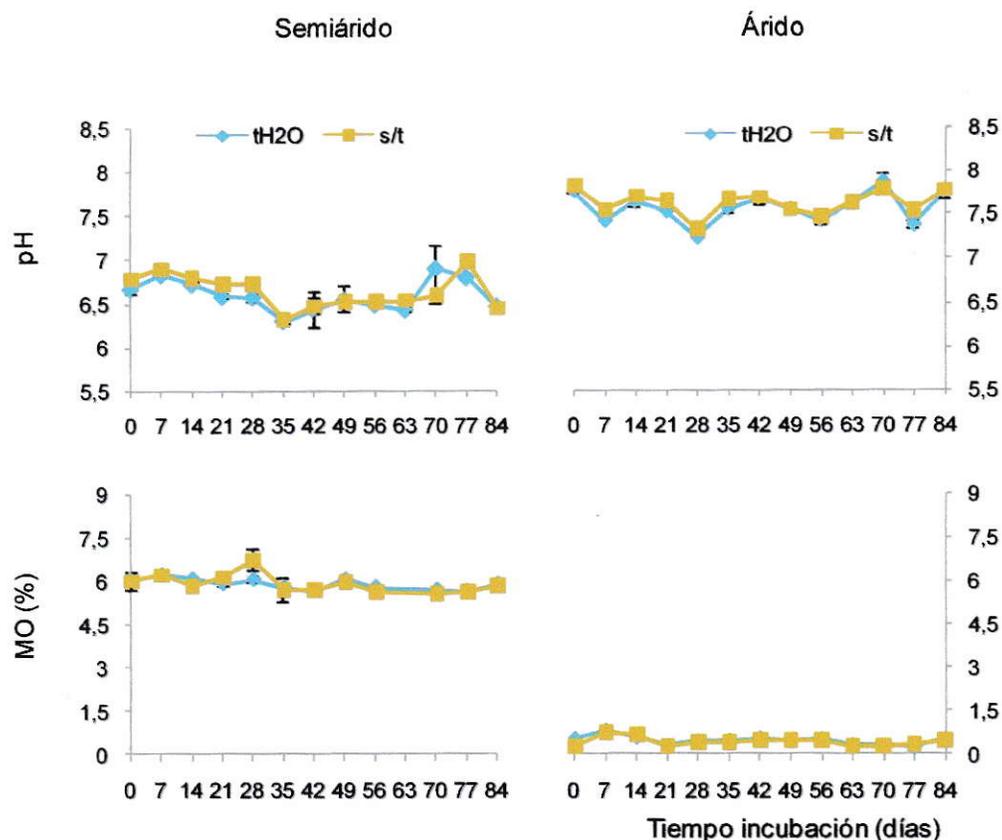


Figura 6. Contenido de materia orgánica (MO) y pH determinados durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto). Valores promedio \pm EE. Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días (rombos, línea azul); s/t: control sin tratamiento (cuadrados, línea café).

En los microcosmos con suelo semiárido tratado con agua, el contenido de nitrato (NO₃⁻) presentó un claro aumento en comparación con el microcosmos control, llegando a superar en más de 5 veces su contenido inicial. Esto a diferencia de las muestras control que no presentaron variaciones durante el período de incubación. En los microcosmos de suelo árido, el contenido de NO₃⁻ presentó un leve aumento hacia los tiempos finales de incubación en los suelos tratados con agua. Sin embargo, su aumento es marginal en comparación al registrado en el suelo semiárido (Figura 7). El contenido inicial de amonio (NH₄⁺) fue prácticamente cero en el suelo árido, y cercano

a $20 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$ en el suelo semiárido. En ambos tipos de microcosmos el contenido de amonio mostró fluctuaciones durante el tiempo de incubación, independientes del tratamiento aplicado. (Figura 7).

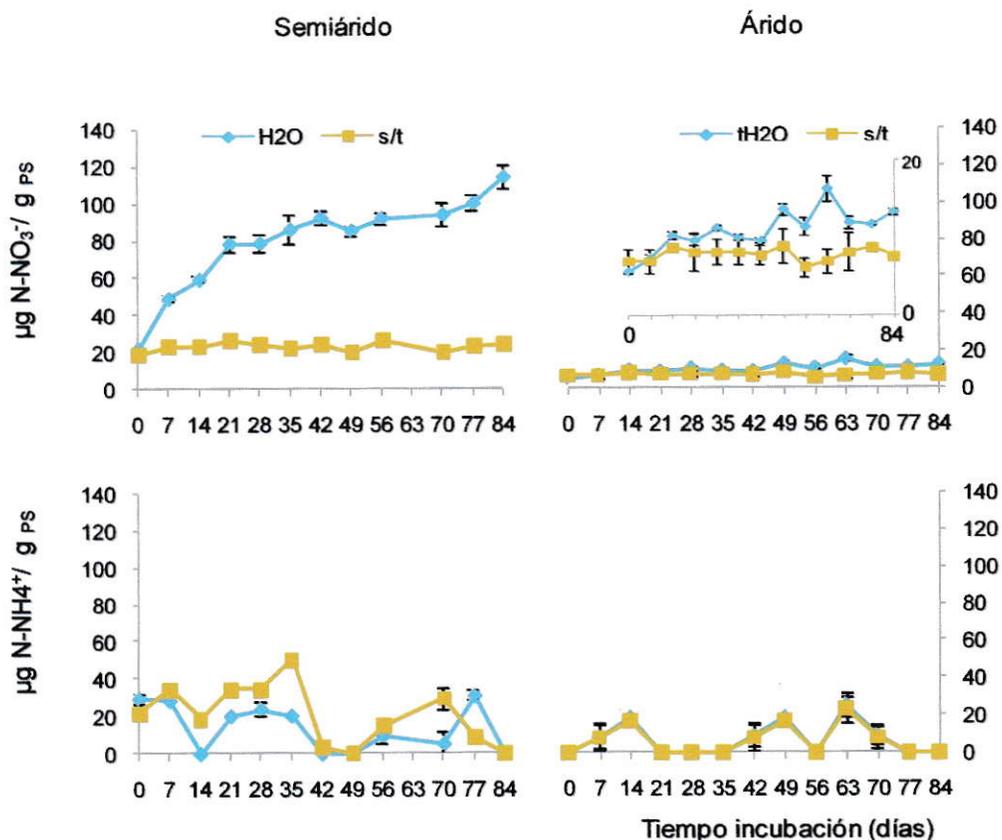


Figura 7. Contenido de amonio ($\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$) y contenido de nitrato ($\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}_{\text{PS}}^{-1}$) determinados durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto). Valores promedio \pm EE. Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días (rombos, línea azul); s/t: control sin tratamiento (cuadrados, línea café).

El análisis de la correlación de los parámetros edáficos se muestra en las Tablas 2 y 3. Los datos muestran que en los microcosmos de suelo semiárido tratados con agua hay una correlación negativa, estadísticamente significativa entre los

contenidos de MO y NO_3^- ($r = -0,64$; $P = 0,02$) (tabla 2), pero no hay una disminución importante de la materia orgánica durante la incubación que sugiera una correlación con el aumento del nitrato. Por su parte, en los microcosmos control (s/t) de suelo árido, los datos indican una correlación negativa entre el CH y la MO ($r = -0,69$; $P = 0,01$), aunque en estos casos los valores son muy pequeños, y no presentaron variación durante la incubación (Tabla 3).

Una fuerte correlación entre las variables edáficas podría afectar algunos análisis posteriores de los datos, como el CCA (Análisis de Correspondencia Canónica) haciendo los coeficientes de correlación muy inestables (Ter Braak 1990). Sin embargo, los parámetros edáficos estudiados no mostraron una fuerte correlación entre ellos ($r > 0,9$) (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Correlaciones de Pearson entre los parámetros edáficos de los microcosmos del suelo Semiárido.

		Semiárido									
		NO_3		NH_4		pH		ORP		CH	
		r	P	R	p	R	P	R	P	r	P
H_2O^b	NH_4^a	-0,47	0,11								
	pH	-0,34	0,26	0,32	0,29						
	ORP	0,18	0,55	0,18	0,55	-0,15	0,62				
	CH	0,20	0,53	-0,40	0,20	0,04	0,90	0,34	0,27		
	MO	-0,64	0,02	0,14	0,67	0,17	0,61	-0,13	0,68	-0,26	0,41
s/t	NH_4	0,00	1,00								
	pH	-0,05	0,88	0,04	0,89						
	ORP	-0,08	0,79	-0,07	0,82	-0,18	0,56				
	CH	-0,47	0,12	0,13	0,68	0,36	0,25	0,13	0,68		
	MO	0,18	0,58	0,32	0,31	0,34	0,28	-0,03	0,92	0,13	0,69

^aContenido de amonio (NH_4); pH; potencial de óxido reducción (ORP); Contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de nitrato (NO_3). ^bTratamientos: H_2O : agua desionizada cada 14 días; s/t: control sin tratamiento.

Tabla 3. Correlaciones de Pearson entre los parámetros edáficos de los microcosmos del suelo Árido.

		Árido									
		NO ₃		NH ₄		pH		ORP		CH	
		r	p	R	p	R	p	R	p	R	P
tH ₂ O ^b	NH ₄ ^a	0,48	0,10								
	pH	0,00	0,99	0,25	0,40						
	ORP	0,52	0,07	-0,02	0,94	-0,23	0,44				
	CH	0,27	0,38	-0,26	0,39	0,34	0,26	0,36	0,23		
	MO	-0,55	0,05	0,02	0,95	-0,06	0,83	-0,18	0,55	-0,12	0,69
s/t	NH ₄	0,14	0,64								
	pH	0,00	0,99	0,07	0,82						
	ORP	-0,18	0,55	0,10	0,74	-0,41	0,17				
	CH	0,21	0,49	0,11	0,72	0,29	0,34	0,34	0,26		
	MO	-0,05	0,88	0,19	0,52	-0,16	0,61	-0,39	0,19	-0,69	0,01

^aContenido de amonio (NH₄); pH; potencial de óxido reducción (ORP); Contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de nitrato (NO₃). ^bTratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: control sin tratamiento.

3.3. Evaluación del efecto del agua sobre la diversidad de las bacterias oxidadoras del amonio βAOB.

Para evaluar el efecto de la adición periódica de agua sobre la diversidad de las bacterias oxidadoras del amonio pertenecientes a las β-proteobacterias (βAOB), se utilizó una aproximación molecular independiente de cultivo. La diversidad de este grupo funcional se evaluó a través del gen del rRNA 16S específico para βAOB.

3.3.1 Extracción del DNA desde muestras de suelo

El DNA extraído a partir del suelo de los microcosmos fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (Figura 8), para determinar la integridad y la concentración aproximada. Para las muestras del suelo árido no se detectó la presencia del DNA genómico en el gel pero se corroboró la extracción del DNA por amplificación del gen del rRNA 16S (Figura 9).

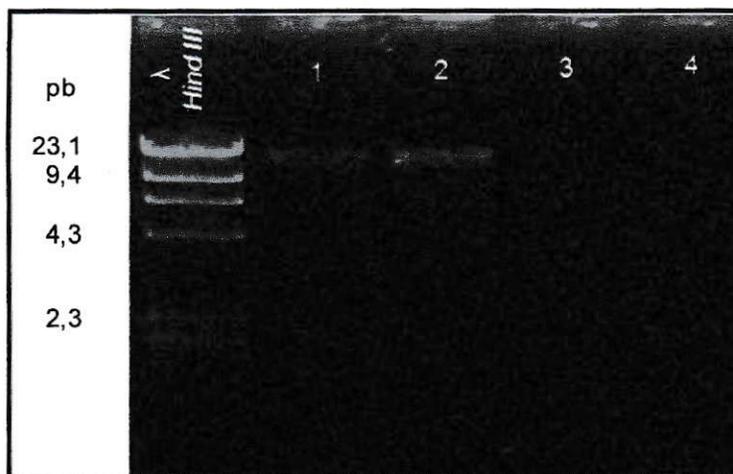


Figura 8. Electroforesis del DNA genómico en un gel de agarosa al 0,8%. Pocillo: 1, DNA suelo semiárido tH₂O t28; 2, DNA suelo semiárido s/t t28; 3, DNA suelo árido tH₂O t28; 4, DNA suelo árido s/t t28, como marcador de peso molecular se utilizó λ-HindIII.

3.3.2 Amplificación del gen del rRNA 16S de las β-proteobacterias

La diversidad genética del gremio de los oxidadores de amonio se evaluó en base a la diversidad del gen del rRNA 16S específico para β-proteobacterias, amplificado mediante un PCR anidado. La amplificación del fragmento esperado se verificó en geles de agarosa al 1,2%. Para la primera reacción de amplificación, se utilizaron los partidores fD1 y rP2, y se obtuvo un fragmento de 1500 pb (Weisburg y col. 1991) (Figura 9). Para la segunda reacción, se usaron los partidores β-AMOf marcado con fluorescencia y β-AMOr (McCaig y col. 1994), se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1200 pb de acuerdo a lo esperado (Figura 10). Los tamaños esperados fueron corroborados luego de la reacción de PCR mediante el marcador de peso molecular 100 bp ladder (Gibco BRL®).

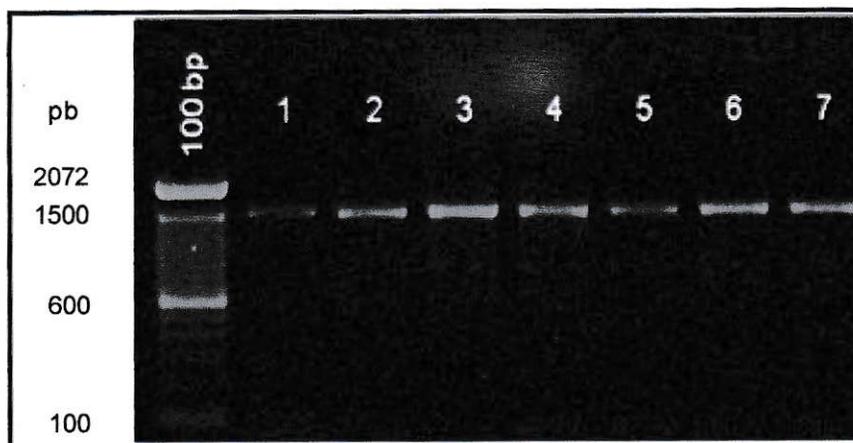


Figura 9. Electroforesis de los amplicones del gen del rRNA 16S con los partidores fD1 y rP2 en un gel de agarosa al 1,2%. Pocillo: 1, suelo semiárido tH₂O t28; 2, suelo semiárido tH₂O t84; 3, suelo semiárido s/t t28; 4, suelo semiárido s/t t84; 5, suelo árido tH₂O t28; 6, suelo árido tH₂O t84; 7, s/t t28. Se verificó el tamaño esperado (1500 pb) con el marcador de peso molecular 100 bp.

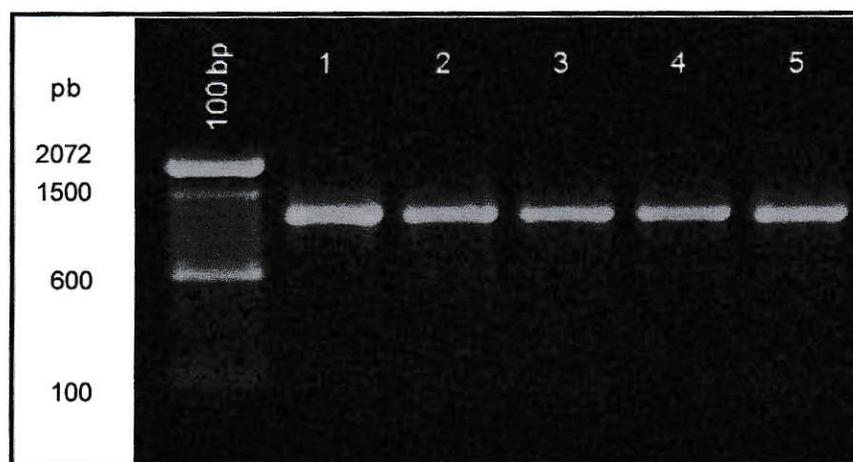


Figura 10. Electroforesis de los productos de la segunda amplificación del gen del rRNA 16S específico para β proteobacterias con los partidores β -AMOf y β -AMOr en un gel de agarosa al 1,2%. Pocillo: 1, suelo semiárido tH₂O t28; 2, suelo semiárido tH₂O t84; 3, suelo semiárido s/t t28; 4, suelo árido tH₂O t28; 5, suelo árido s/t t28. Se verificó el tamaño esperado (1200 pb) con el marcador de peso molecular 100 bp.

3.3.3 Perfiles de T-RFLP

Los perfiles de T-RFLP para los amplicones de β AOB se analizaron para cada tratamiento durante el tiempo de incubación, con dos enzimas de restricción (*HhaI* y *HaeIII*). Los perfiles obtenidos muestran que la fluorescencia está restringida a 8 fragmentos terminales de restricción (T-RFs), 4 para *HhaI* y 4 para *HaeIII*.

La frecuencia relativa de los principales T-RFs durante el período de incubación para ambos tipos de suelos se muestra en la Figura 11. En ambos suelos se observaron los mismos T-RFs presentes, aunque sus abundancias relativas fueron distintas.

Al analizar los T-RFs obtenidos (riqueza) y su fluorescencia relativa (abundancia), en función del tiempo de incubación, se observó algunas diferencias en cuanto a la estructura de cada muestra. En suelo semiárido (Figura 11), los fragmentos de 64 pb y 237 pb predominaron en el comienzo de la incubación, pero ya a los 28 días de incubación se observó una presencia importante de los T-RFs de 71 pb y 85 pb, los que predominan en la segunda mitad de la incubación. Por el contrario, los fragmentos de 64 pb y 237 pb pasaron a representar una porción mínima del ensamble de las AOB en los tiempos 56 y 84 días de incubación, tanto en el tratamiento con agua desionizada cada 14 días (tH₂O) como en el control sin tratamiento (s/t).

En el suelo árido (Figura 12), los T-RFs de 71 pb y 85 pb, dominantes en un comienzo, pasaron a representar una mínima fracción al final de la incubación, cuando los T-RFs dominantes corresponden a 64 pb, 237 pb y 437 pb. Un aumento notorio del T-RF de 64 pb y una disminución del T-RF de 85 pb se observó a los 28 días de incubación para las muestras tratadas con agua cada 14 días, en cambio en el control

sin tratamiento estos cambios se observaron a partir de los 56 días de incubación. Los perfiles de T-RFLP no mostraron grandes diferencias entre los microcosmos tratados y microcosmos controles para ambos tipos de suelo.

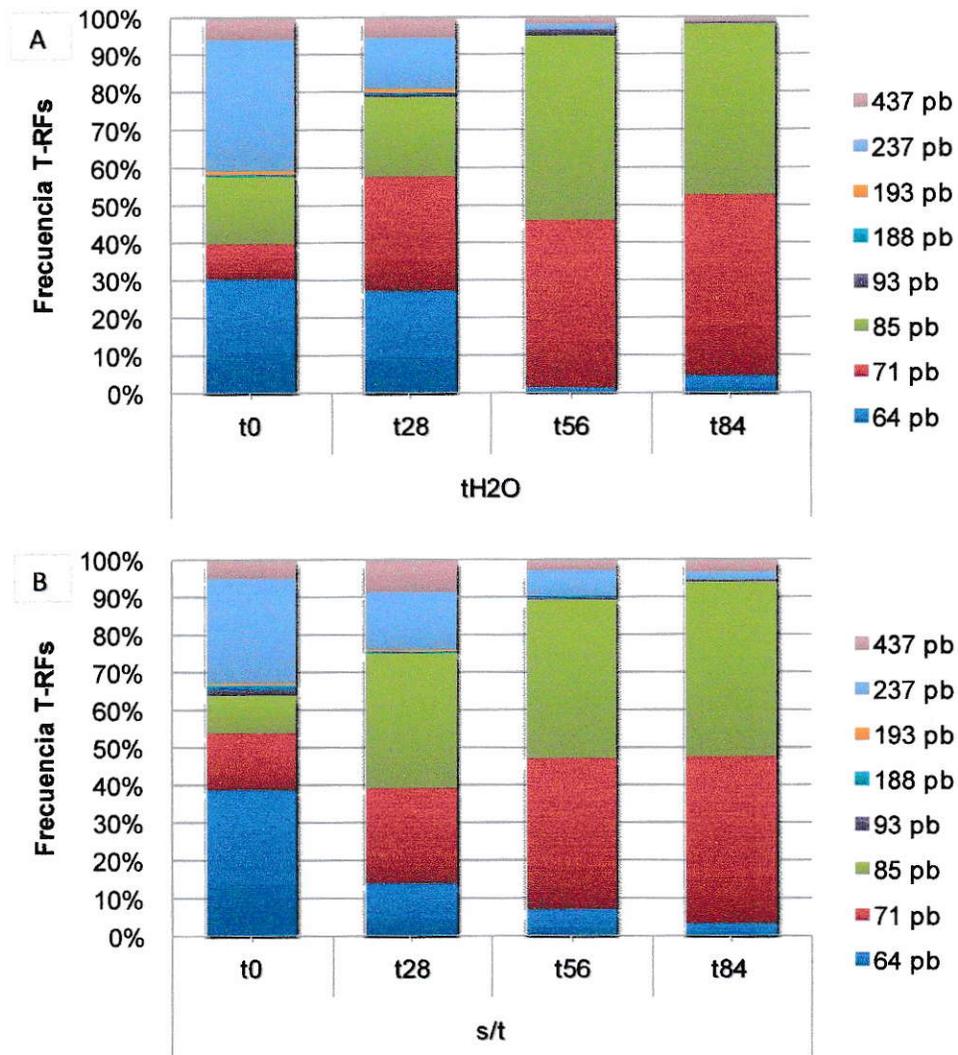


Figura 11. Frecuencia relativa de los principales T-RFs obtenidos para el gen del rRNA 16S de β AOB a diferentes tiempos de incubación de los microcosmos del suelo semiárido: A, tratado y B, control. Los diferentes colores indican el tamaño en pares de bases de cada fragmento y la frecuencia de cada T-RF se expresó como el porcentaje relativo de las UF totales normalizadas. Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: control sin tratamiento. Tiempos: t0: 0 días de incubación; t28: 28 días de incubación; t56: 56 días de incubación; t84: 84 días de incubación.

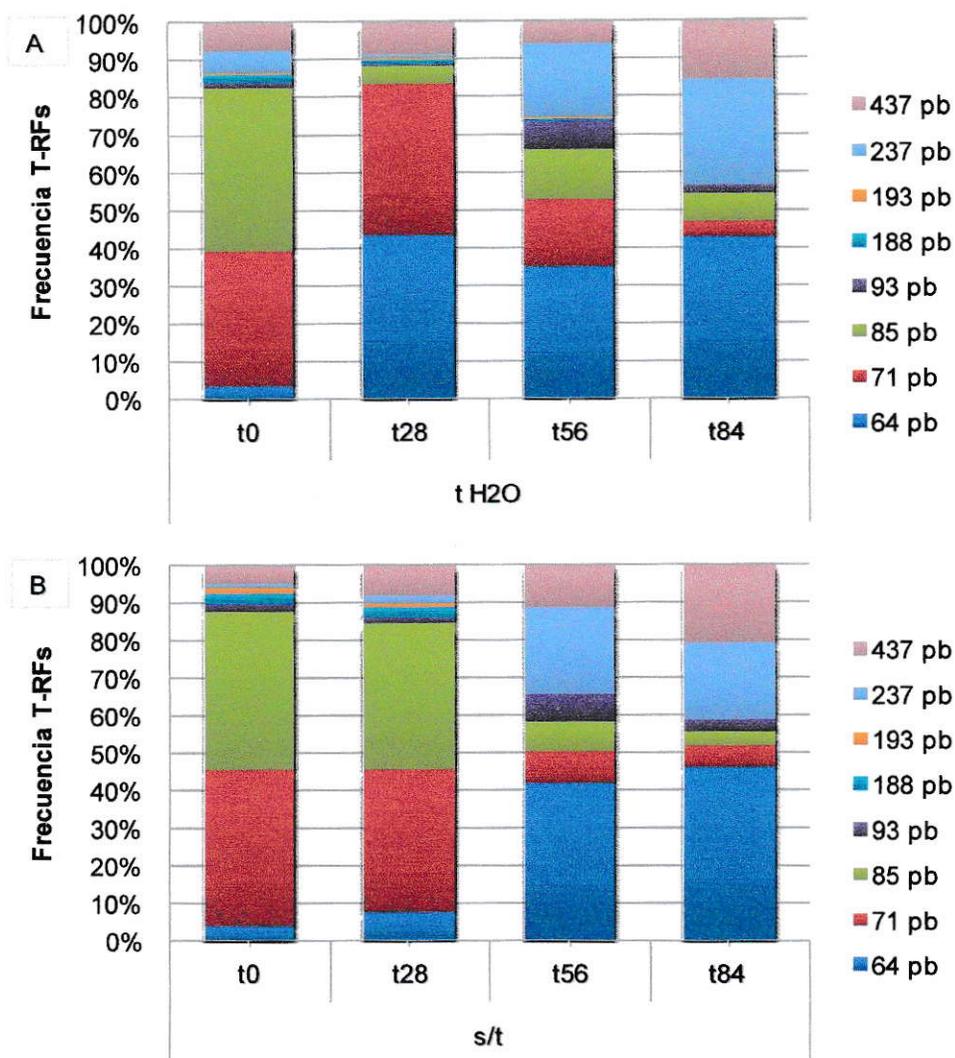


Figura 12. Frecuencia relativa de los principales T-RFs obtenidos para el gen del rRNA 16S de β AOB a diferentes tiempos de incubación de los microcosmos del suelo árido: A, tratado y B, control. Los diferentes colores indican el tamaño en pares de bases de cada fragmento y la frecuencia de cada T-RF se expresó como el porcentaje relativo de las UF totales normalizadas. Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: control sin tratamiento. Tiempos: t0: 0 días de incubación; t28: 28 días de incubación; t56: 56 días de incubación; t84: 84 días de incubación.

En la Tabla 4 se muestra la asociación de los T-RFs encontrados con la base de datos del GeneBank, mediante el programa MICA (Shyu y col. 2007). Los T-RFs de 188 pb y 237 pb fueron asociados a *Nitrosomonas*, mientras que el T-RF de 437 pb se asoció a *Nitrospira* según el programa MICA. Los otros T-RFs no aparecen en la base de datos y se designaron como no identificados, excepto el T-RF de 85 bp que está relacionado con las AOB no cultivadas.

Tabla 4. Asociación de T-RFs obtenidos para el gen del rRNA 16S de β AOB a géneros de oxidadores de amonio con el programa MICA.

Tamaño (pb)	Grupo relacionado	Enzima de Restricción
64	N/I	<i>HaeIII</i>
71	N/I	<i>HhaI</i>
85	AOB no cultivada	<i>HaeIII</i>
93	N/I	<i>HhaI</i>
188	<i>Nitrosomonas</i>	<i>HaeIII</i>
193	N/I	<i>HaeIII</i>
237	<i>Nitrosomonas</i>	<i>HhaI</i>
437	<i>Nitrospira</i>	<i>HhaI</i>

N/I: no identificado

El análisis de agrupamiento de los perfiles de T-RFLP mostró la asociación de los microcosmos en dos grupos, relacionados más bien con el tiempo de incubación que con el tipo de tratamiento. Los patrones de T-RFLP de los ensambles AOB de los tiempos iniciales (t0 y t28) presentaron una tendencia a separarse de los ensambles de

las AOB de los tiempos finales (t56 y t84) para ambos tipos de suelos (figura 13). No se observó efecto del tratamiento sobre el agrupamiento de las muestras.

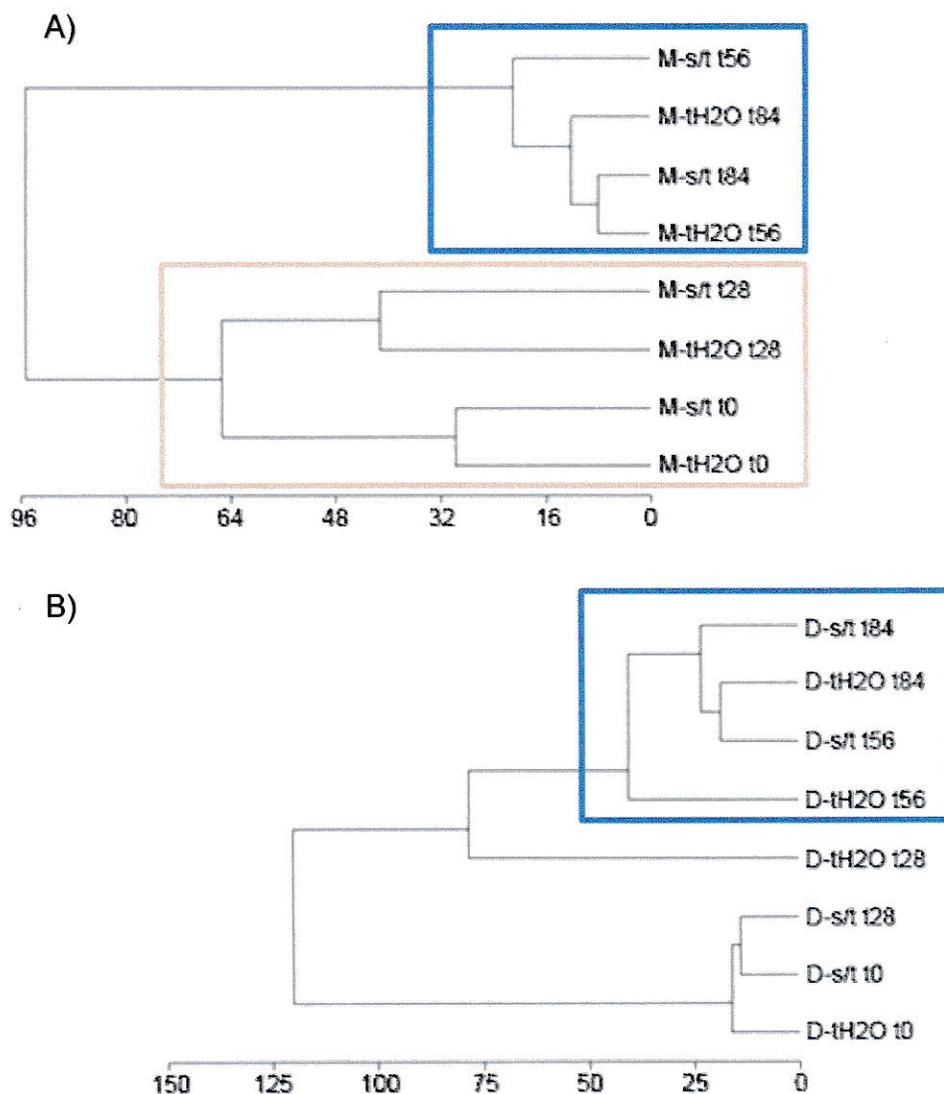


Figura 13. Análisis de agrupamiento del gremio de las bacterias oxidadoras de amonio de los suelos A), semiárido (M: matorral) y B), árido (D: desierto) bajo cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos. Se usó como base el porcentaje de abundancia relativa de los T-RFs resultantes del ensayo de T-RFLP. Los dendrogramas se construyeron mediante la distancia Euclídeana y el algoritmo UPGMA (Programa MVSP). Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: control sin tratamiento. Tiempos: t0: 0 días de incubación; t28: 28 días de incubación; t56: 56 días de incubación; t84: 84 días de incubación.

De acuerdo al análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de T-RFLP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos, las muestras presentaron una tendencia a separarse por el tipo de suelo con respecto al segundo eje canónico (CCA2). Los parámetros edáficos que influenciaron esta separación fueron el pH, la MO y el NH_4^+ con coeficientes de correlación intragrupo de -0,83, 0,61 y -0,81 respectivamente (Figura 14 y Tabla 5).

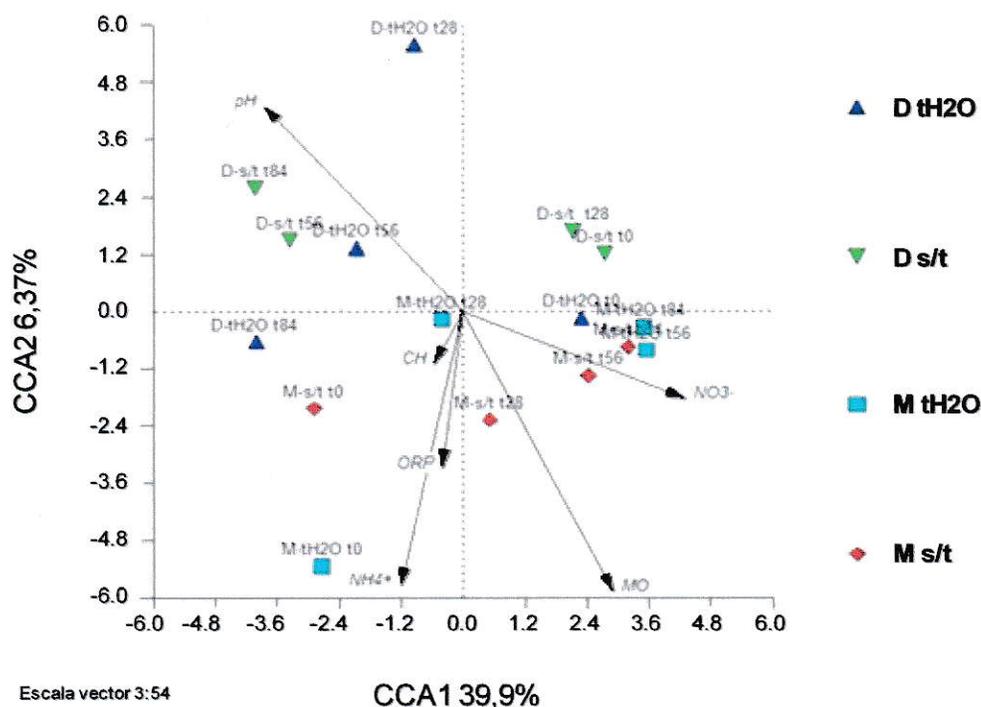


Figura 14. Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de T-RFLP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (M: matorral) y árido (D: desierto). Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: sin tratamiento. Tiempos: t0: 0 días de incubación; t28: 28 días de incubación; t56: 56 días de incubación; t84: 84 días de incubación. Parámetros edáficos: pH; potencial de óxido reducción (ORP); Contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH₄⁺); contenido de nitrato (NO₃⁻).

Además se observó un efecto del primer eje canónico (CCA1) que separó las muestras del mismo tipo de suelo por tiempo de incubación, de manera similar a lo encontrado en los dendrogramas (Figura 13). El coeficiente de correlación intragrupo más influyente para este eje (0,61) corresponde al NO_3^- (Tabla 6). Los dos ejes representados explicaron el 46,4% de la varianza total.

Tabla 5. Coeficientes canónicos y de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los T-RFs, en los microcosmos de los suelos árido y semiárido.

Parámetros	Coeficientes de Correlación Intragrupo		Coeficientes Canónicos	
	CCA1	CCA2	CCA1	CCA2
NO_3^-	0,61	-0,26	0,34	0,53
NH_4^+	-0,17	-0,81	-0,77	0,13
pH	-0,54	0,61	-0,69	-1,15
ORP	-0,06	-0,47	-0,60	0,03
MO	0,41	-0,83	0,56	-2,29
CH	-0,08	-0,16	-0,35	-0,35

El índice de diversidad y equidad de la comunidad de AOB fue estimada a partir de los perfiles de T-RFLP del gen del rRNA 16S β AMO (Tabla 6). El suelo semiárido presentó una tendencia a la disminución de la diversidad y de la equidad hacia los tiempos finales de incubación. En el suelo árido la diversidad se mantuvo relativamente constante con un valor más elevado hacia el día 56 de incubación y la equidad aumentó en la segunda mitad del periodo de incubación. No se observó efecto del tratamiento sobre los índices de diversidad. Al comparar los microcosmos de ambos suelos, los índices de diversidad y de equidad fueron mayores en suelo semiárido al inicio de la incubación, pero en el segundo período de incubación, estos índices fueron mayores en los microcosmos del suelo árido.

Tabla 6. Parámetros de diversidad estimados mediante perfiles de T-RFLP del gen del rRNA 16S β AMO de los suelos árido y semiárido.

	Muestra	Semiárido			Árido		
		Índice de Diversidad	Equidad	Nº. T-RFs	Índice de Diversidad	Equidad	Nº. T-RFs
tH ₂ O ^b	t0 ^a	0,66	0,78	7	0,60	0,66	8
	t28	0,69	0,76	8	0,54	0,60	8
	t56	0,42	0,54	6	0,73	0,81	8
	t84	0,40	0,57	5	0,61	0,79	6
s/t	t0	0,66	0,73	8	0,56	0,62	8
	t28	0,67	0,74	8	0,62	0,69	8
	t56	0,54	0,64	7	0,68	0,87	6
	t84	0,46	0,60	6	0,61	0,78	6

^aTiempos: t0: 0 días de incubación; t28: 28 días de incubación; t56: 56 días de incubación; t84: 84 días de incubación. ^bTratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: control sin tratamiento.

3.4. Evaluación del efecto del agua sobre la diversidad metabólica de la comunidad microbiana

Para evaluar si la adición de agua afecta la diversidad metabólica, se determinaron perfiles metabólicos de la comunidad microbiana total, usando Biolog EcoPlate™. Las muestras analizadas corresponden al inicio (0 días de incubación), a la mitad (42 y 36 días de incubación para el suelo semiárido y árido, respectivamente) y al final (84 días de incubación) del período de incubación de los microcosmos.

Se calcularon los valores de Diversidad Metabólica de la Comunidad (CMD) que corresponden al promedio de fuentes de carbono utilizadas durante el tiempo de incubación de las muestras y se construyeron curvas de CMD versus tiempo para los microcosmos de los suelos semiárido y árido (Figura 15).

La utilización de las fuentes de carbono se inició luego de 24 h de incubación de las placas para el suelo semiárido y luego de 48 h para el suelo árido. La comunidad microbiana del suelo semiárido utilizó un número mayor de fuentes de carbono comparada con la comunidad del suelo árido, independientemente del tratamiento aplicado.

No se observaron diferencias asociadas al tratamiento aplicado en el suelo semiárido. Sin embargo en el suelo árido se observó un número mayor de fuentes de carbono utilizadas en las muestras tratadas con agua cada 14 días, con respecto a los controles no tratados, excepto al final del período de incubación.

Los perfiles de CMD muestran actividad al inicio, durante y hacia el final de la incubación de los microcosmos, indicando la presencia de un potencial metabólico latente durante todo el ensayo. Aún cuando hacia el día 84 existió una pequeña disminución general en el número de fuentes de carbono utilizadas (Figura 15).

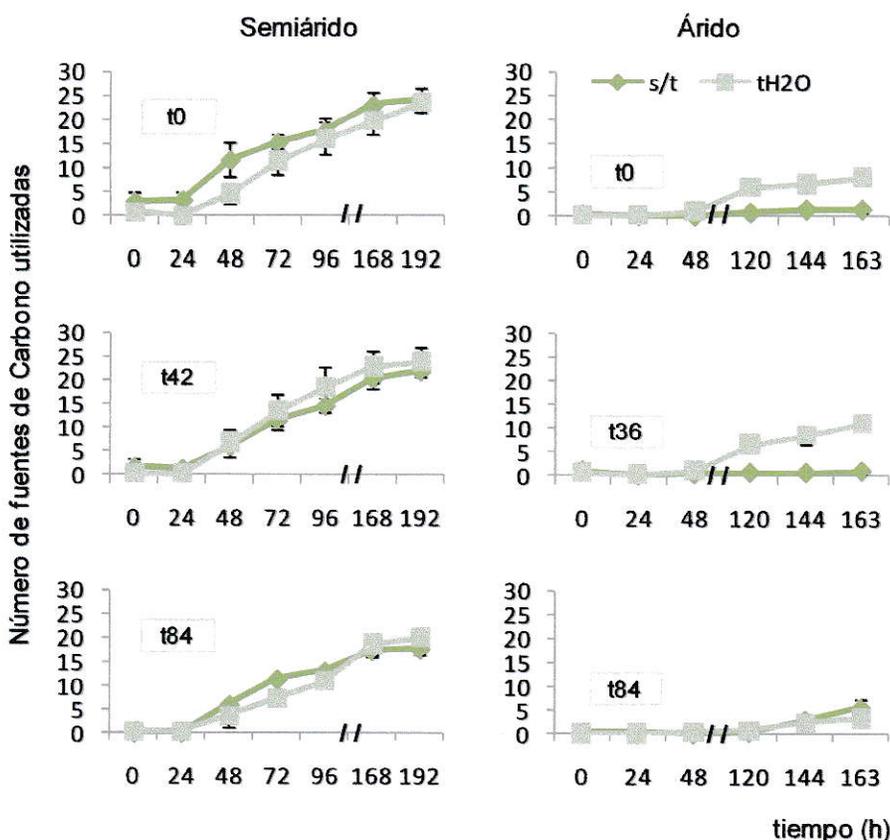


Figura 15. Curvas de Diversidad Metabólica de las Comunidades (CMD) promedio \pm E.E. para cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto). Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: sin tratamiento. Tiempos: t0: 0 días de incubación; t36: 36 días de incubación (suelo árido); t42: 42 días de incubación (suelo semiárido); t84: 84 días de incubación.

El análisis de agrupamiento de los patrones metabólicos no mostró efecto del tratamiento con agua cada 14 días, en los microcosmos de suelos semiáridos. Sin embargo, las muestras del tiempo 84 (t84) tendieron agrupar separadas del resto (Figura 16 A). En suelo árido se observó el efecto del tratamiento a los 0 y 36 días de incubación, los microcosmos tratados se agruparon separados del resto, sin apreciarse efecto del tiempo de incubación (Figura 16 B). Los agrupamientos concuerdan con lo observado en las curvas de CMD (Figura 15).

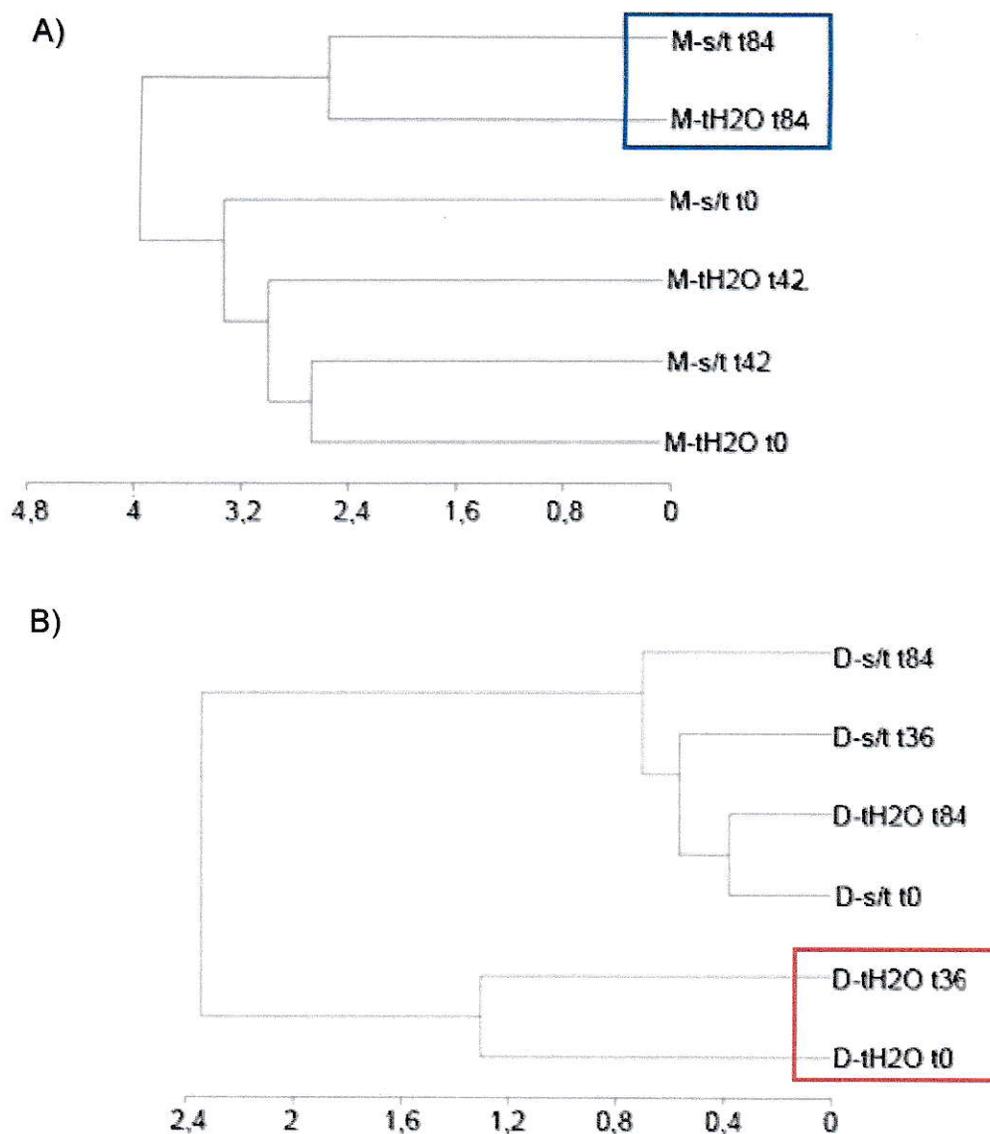


Figura 16. Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de los suelos A), semiárido (M: matorral) y B), árido (D: desierto) bajo cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos. Se usó como base la DO de las fuentes de carbono utilizadas durante el ensayo de CLPP. Los dendrogramas se construyeron usando la distancia Euclídeana y el algoritmo UPGMA (Programa MVSP). Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: control sin tratamiento. Tiempos: t0: 0 días de incubación; t36: 36 días de incubación; t42: 42 días de incubación; t84: 84 días de incubación.

De acuerdo al análisis de correspondencia canónica entre los CLPP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo árido y semiárido, el primer eje (CCA1) da cuenta de la separación de las muestras en dos grupos bien definidos correspondientes a los dos tipos de suelo. Los parámetros edáficos que explicaron esta separación fueron la MO y el pH con coeficientes de correlación intragrupo de $-0,92$ y $0,78$ respectivamente (Figura 17 y Tabla 7). Los dos ejes del agrupamiento representan un $43,6\%$ de la varianza total.

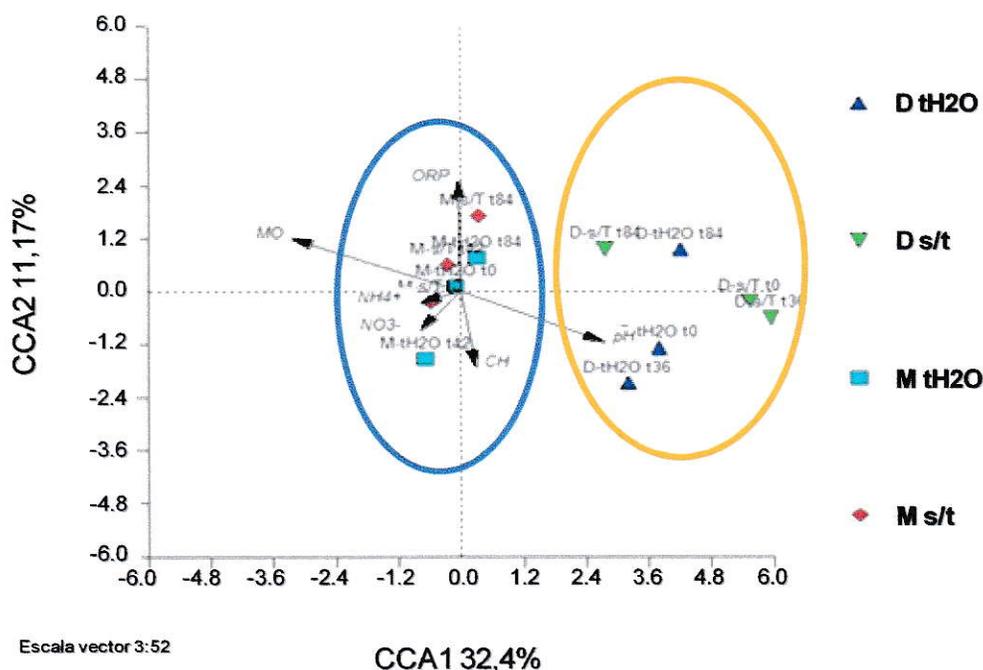


Figura 17. Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles fisiológicos (CLPP) y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (M: matorral) y árido (D: desierto). Tratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: sin tratamiento. Tiempos: t0: 0 días de incubación; t36: 36 días de incubación (suelo árido); t42: 42 días de incubación (suelo semiárido); t84: 84 días de incubación. Parámetros edáficos: pH; potencial de óxido reducción (ORP); Contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH₄⁺); contenido de nitrato (NO₃⁻).

Tabla 7. Coeficientes canónicos y de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los ejes 1 y 2 del ordenamiento de los CLPP, en los microcosmos de los suelos árido y semiárido.

Parámetros	Coeficientes de Correlación Intragrupo		Coeficientes Canónicos	
	CCA1	CCA2	CCA1	CCA2
NO ₃ ⁻	-0,22	-0,25	-0,28	-0,20
NH ₄ ⁺	-0,21	-0,07	-0,25	0,02
pH	0,78	-0,33	-0,19	-1,33
ORP	-0,01	0,71	0,45	0,97
MO	-0,92	0,34	-1,12	-1,14
CH	0,08	-0,49	0,19	-0,43

Con el fin de realizar un análisis más detallado de los perfiles metabólicos de las comunidades microbianas de cada suelo hacia el final de la incubación de las ecoplacas se realizó una estimación de la diversidad metabólica de la comunidad microbiana a partir de las fuentes de carbono consumidas, las cuales fueron clasificadas en 7 categorías (Tabla 8). Todas las categorías fueron utilizadas en el suelo semiárido sin evidenciar diferencias por el tratamiento. De las siete categorías de fuentes de carbonos, dos de ellas (aminas y químicos fosforilados) no fueron utilizadas por la comunidad microbiana del suelo árido y las cinco restantes (carbohidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, polímeros y ésteres) registraron un aumento en el número de fuentes utilizadas con el tratamiento.

Tabla 8. Proporción de las fuentes de carbono utilizadas separadas por categorías.

			Carbohidratos	Ácidos Carbox.	Amino Ácidos	Polímeros	Aminas	Ésteres	Químicos Fosforilados
Semiárido	tH ₂ O ^b	t0 ^a	7/7	6/9	5/6	4/4	1/2	1/1	1/2
		t42	7/7	7/9	5/6	4/4	1/2	1/1	1/2
		t84	7/7	5/9	5/6	3/4	1/2	1/1	1/2
	s/t	t0	7/7	7/9	6/6	4/4	1/2	1/1	1/2
		t42	7/7	7/9	5/6	4/4	1/2	1/1	1/2
		t84	5/7	6/9	4/6	3/4	1/2	1/1	1/2
Árido	tH ₂ O	t0	0/7	1/9	1/6	3/4	0/2	1/1	0/2
		t36	1/7	2/7	1/6	4/4	0/2	1/1	0/2
		t84	1/7	1/7	0/6	2/4	0/2	0/1	0/2
	s/t	t0	0/7	0/7	0/6	1/4	0/2	0/1	0/2
		t36	0/7	0/7	0/6	1/4	0/2	0/1	0/2
		t84	2/7	0/7	0/6	1/4	0/2	0/1	0/2

^aTiempos: t0: 0 días de incubación; t36: 36 días de incubación t42: 42 días de incubación; t84: 84 días de incubación; t84: 84 días de incubación. ^bTratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: control sin tratamiento.

En el suelo semiárido tanto la diversidad metabólica, medida como la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono, como la equidad se mantuvieron relativamente constantes sin importar el tratamiento aplicado. Para el suelo árido la diversidad metabólica fue mayor en las muestras tratadas con agua cada 14 días comparadas con el control no tratado, donde prácticamente hay una mínima capacidad de utilización de las fuentes de carbono ensayadas. Una leve disminución de la diversidad metabólica se registró hacia el final de la incubación de los microcosmos para ambos suelos. Además en todos los casos el índice de diversidad metabólica fue mayor para suelo semiárido independientemente del tratamiento aplicado (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros de diversidad metabólica estimados para la comunidad microbiana de los suelos árido y semiárido a partir de las fuentes de carbono utilizadas en el ensayo de CLPP.

		Semiárido			Árido		
	Muestra	Índice de Diversidad	Equidad	Nº Categorías	Índice de Diversidad	Equidad	Nº Categorías
tH ₂ O ^b	t0 ^a	0,83	0,98	7	0,47	0,78	4
	t42 (t36)	0,83	0,98	7	0,56*	0,80	5
	t84	0,83	0,98	7	0,29	0,95	2
s/t	t0	0,83	0,98	7	0,00	0,00	1
	t42 (t36)	0,83	0,98	7	0,00*	0,00	1
	t84	0,83	0,99	7	0,30	1,00	2

^aTiempos: t0: 0 días de incubación; t42 (t36): 42 días de incubación (36 días de incubación); t84: 84 días de incubación. *: tiempo de incubación para el suelo árido entre paréntesis.

^bTratamientos: tH₂O: agua desionizada cada 14 días; s/t: control sin tratamiento.

4. DISCUSIÓN

Varios reportes indican que la estructura de las comunidades microbianas en los ecosistemas terrestres está influenciada por factores como la temperatura (Ferroni y col. 1980), el contenido hídrico (Bell y col. 2008), el pH (Fierer y Jackson, 2006), la presencia y tipo de cobertura vegetal (Kuske y col. 2002; Orlando y col. 2007; Farías y col. 2009) o una combinación de ellos. Sin embargo, hay poca información sobre la diversidad genética y funcional de la microbiota de los suelos áridos y cómo ésta se ve afectada por los factores edáficos aun cuando estudios previos sugieren que estos suelos son más diversos comparados con los suelos forestales o agrícolas (Bhatnagar y Bhatnagar, 2005; Orlando, 2008). En las regiones áridas las precipitaciones son escasas y altamente variables, lo que resulta en un bajo contenido hídrico del suelo (Noy-Meir, 1973). En estos ecosistemas se postula que el agua es uno de los factores limitantes del crecimiento microbiano y de la actividad microbiana del suelo, los cuales estarían restringidos a periodos específicos durante los eventos de precipitación (Kieft, 1987; Otter y Scholes, 2005). Los pulsos discontinuos de agua representan, de algún modo, una oportunidad para que la microbiota del suelo responda a la rehidratación, ya sea con cambios en la abundancia relativa de sus miembros o en su actividad (Bell y col. 2008).

En el presente estudio se evaluó el efecto de la adición de agua sobre la composición de un grupo funcional de la comunidad microbiana del suelo, las bacterias oxidadoras de amonio, y cómo se relacionó ésta con la actividad de nitrificación.

4.1. Evaluación del efecto del agua sobre los parámetros edáficos y la capacidad de nitrificación de la microbiota.

Las variables edáficas juegan un papel fundamental en la biogeografía de los microorganismos, y a diferencia de los macroorganismos la estructura de sus comunidades no se relaciona directamente a los factores como latitud o distancias geográficas (Fierer y Jackson, 2006).

Aunque se sugiere que el pH es uno de parámetros edáficos que afectarían la diversidad de las comunidades microbianas a nivel global (Fierer y Jackson, 2006), en los suelos estudiados el pH presentó valores cercanos a la neutralidad, siendo levemente más ácido el suelo semiárido. Además, no se produjeron cambios de pH por efecto de la adición de agua, lo que coincide con estudios anteriores realizados con estos suelos (Orlando, 2008). De acuerdo a Fierer y Jackson (2006) se encuentra una mayor diversidad microbiana en los suelos con valores de pH neutros, con una marcada disminución de la diversidad a medida que aumenta la acidez. Los valores de pH registrados para ambos suelos estudiados se encuentran dentro del rango en que el crecimiento de las AOB es más favorable, aún cuando bacterias oxidadoras de amonio también han sido aisladas de ambientes ácidos (De Boer y Laandbroek, 1989, Allison y Prosser, 1991, Jiang y Bakken, 1999).

Por otra parte Nicol y col. (2008) evaluaron el efecto del pH del suelo (4,9 a 7,5) sobre la actividad transcripcional de los oxidadores de amonio, en suelo agrícola, encontrando una mayor abundancia de los transcritos de AOB a mayor pH, lo cual sugiere que a valores cercanos a la neutralidad se podría esperar una mayor actividad de nitrificación. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde se

observa un aumento claro de la nitrificación en los microcosmos de los suelos semiáridos con pH entre 6,5 - 7 en comparación con los microcosmos de los suelos áridos con pH sobre 7,5 que presentan una nitrificación marginal cuando aumenta el contenido hídrico. No obstante otros factores edáficos contribuyen a esta actividad en los suelos áridos.

Con el aumento en el contenido hídrico (CH) de los microcosmos se espera reducir la condición de estrés hídrico que se presenta en los suelos áridos y semiáridos favoreciendo la actividad de nitrificación. Considerando que el paso inicial de la nitrificación es la oxidación del amonio, la cual se produce mayoritariamente en condiciones aeróbicas, la hidratación del suelo se realizó al 60% de la capacidad de retención de cada suelo para no reducir la condición aeróbica de los microcosmos. Durante todo el tratamiento se registró el potencial redox y de este modo se descartó que la baja actividad de nitrificación observada en los suelos áridos estuviera relacionada con una condición anaeróbica de éste, como describe Niklaus y col. (2001).

Un aumento marcado en la actividad potencial de nitrificación, fue detectado sólo en el suelo semiárido tratado periódicamente con agua, lo que es consistente con otros estudios en donde existe un efecto positivo del incremento de la humedad sobre la actividad microbiana (Stark y Firestone, 1995; Avrahami y Bohannan, 2007). Sin embargo, los microcosmos de suelo árido tratados con agua mostraron una actividad nitrificante marginal al final del período de incubación. La explicación a estas diferencias en la actividad de nitrificación potencial con la adición de agua, podría estar dada por los distintos contenidos de materia orgánica (MO) y concentración de amonio (NH_4^+) de los suelos estudiados. Según Kandeler y col. (2006) el contenido de MO se

relaciona con la abundancia de microorganismos, lo que sugiere una mayor abundancia microbiana en el suelo semiárido. Por lo tanto, en los suelos semiáridos podría haber un aporte continuo de amonio vía amonificación de la materia orgánica presente en estos suelos (Espinosa, 2007), lo que permitiría sustentar la actividad nitrificante observada. Por el contrario, el contenido de NH_4^+ y MO es menor en el suelo árido lo que limitaría la actividad de oxidación de amonio de las AOB, por disponibilidad de sustrato. Los datos sugieren que la mayor disponibilidad de MO favorecería el proceso de amonificación e indirectamente sustentaría la nitrificación, en condiciones no limitantes de H_2O .

Estudios realizados en suelos agrícolas con prácticas de fertilización, sugieren que un aumento en el contenido de carbono y nitrógeno produciría una mayor abundancia de las AOB medida como el aumento en el número de copias de genes funcionales (Leininger y col. 2006; He y col. 2007), lo que podría explicar la mayor actividad nitrificante en el suelo semiárido, con mayor contenido de MO y NH_4^+ , en comparación con los microcosmos de suelo árido. También Hasting y col. (2000) plantean que la adición de agua favorecería el aumento en la abundancia de las AOB. Sin embargo, otros investigadores sugieren que el aumento de la actividad de nitrificación observado por la adición de agua estaría dado por un cambio fisiológico de la comunidad de AOB, más que por un cambio en su abundancia (Avrahami y Bohannan, 2007).

4.2. Efecto del agua sobre la diversidad de las bacterias oxidadoras del amonio β AOB.

Los perfiles de T-RFLP obtenidos para el gen del rRNA 16S específico para β AOB mostraron cambios en la estructura de la comunidad de nitrificadores. Sin embargo, estos cambios no tuvieron relación directa con la adición de agua, sino con el tiempo de incubación de los microcosmos, separándose las muestras correspondientes a la primera mitad, de las obtenidas durante la segunda mitad del periodo de incubación. Este comportamiento de los patrones puede estar relacionado con los largos tiempos generacionales de estos microorganismos (Avrahami y Bohannan, 2007), por lo que se podría esperar que los cambios en la estructura de este gremio bacteriano sean lentos.

La asociación de T-RFs con la base de datos MICA, sugiere la presencia de *Nitrosomonas* y *Nitrospira*, dos géneros descritos en ambientes tales como lagos (Whitby y col. 2001), sedimentos marinos (Stephen y col. 1996; Kowalchuk y Stephen, 2001) y también en diversos tipos de suelos (Stephen y col. 1996; Bothe y col. 2000; Kowalchuk y col. 2000; Kowalchuk y Stephen, 2001). Además algunos estudios muestran una dominancia de *Nitrospira* sobre *Nitrosomonas* en suelo (Kowalchuk y Stephen, 2001; Whitby y col. 2001), lo que concuerda con la dominancia de clones asociados a *Nitrospira* observada con anterioridad en los suelos del presente estudio (Espinosa, 2007; Orlando, 2008).

El índice de diversidad estimado en los distintos tiempos durante la incubación muestra una disminución de la diversidad en suelo semiárido y un leve aumento en suelo árido, en ambos casos independientemente del tratamiento aplicado. Los

cambios en diversidad se producen más bien por cambios en la abundancia relativa más que en la riqueza de T-RFs, teniendo en cuenta que entre dos comunidades distintas con el mismo número de especies, es más diversa aquella que presenta una comunidad más equitativamente representada (Hedrick, 2000).

El análisis de CCA aplicado a los perfiles de T-RFLP señala que las diferencias entre las estructuras del gremio β AOB de estos suelos son explicadas principalmente por el pH, contenido de NH_4^+ y MO, en concordancia con estudios realizados por Princic y col. (1998) que determinaron que el pH, las concentraciones de amonio y oxígeno afectan la actividad y diversidad de las bacterias nitrificadoras.

Durante la incubación, no se observó una asociación entre el aumento de la actividad nitrificante y cambios en la estructura de la comunidad de AOB, lo cual sugiere que la adición de agua produciría más bien un cambio fisiológico de la comunidad de las AOB, más que un cambio en su abundancia o riqueza, de acuerdo a lo observado por Avrahami y Bohannan (2007). Por su parte Kowalchuk y Stephen (2001) propusieron previamente, que las AOB podrían responder rápidamente a cambios en el ambiente aumentando su actividad metabólica sin generar cambios en la composición del gremio, como se ha observado en estudios de fertilización (Avrahami y col. 2002; Espinosa, 2007; Orlando, 2008). Sin embargo, existen evidencias del aumento en la abundancia de las AOB con el aumento del contenido de agua (Avrahami y Bohannan 2007); incluso Jia y Conrad (2009) encontraron un paralelo entre la abundancia de las AOB y la actividad de nitrificación en suelo.

Otro factor a tener en cuenta, para comprender el papel de los microorganismos en el proceso de nitrificación, es que las AOB son sólo una fracción de los

microorganismos nitrificantes del suelo (Bothe y col. 2000; Silyn-Roberts y Lewis, 2001) aunque por mucho tiempo fueron consideradas como los únicos responsables de realizar este proceso (Kowalchuk y Stephen, 2001; Koops y col. 2001; Yeager y col. 2004). Estudios metagenómicos revelaron la existencia de un gen para una amonio monoxigenasa arqueal (Venter y col. 2004; Treusch y col. 2005), indicando que existen arqueas oxidadoras de amonio (AOA) con la facultad de realizar esta función. Evidencia reciente muestra que el gen *amoA* arqueal se encuentra en diversos ecosistemas tales como ambientes marinos (Francis y col. 2005; Coolen y col. 2007), en aguas dulces (Beman y Francis, 2006) y ecosistemas terrestres (Leininger y col. 2006), entre otros. Varios autores muestran que en suelo, las arqueas oxidadoras de amonio (AOA) podrían ser más abundantes que su contraparte bacteriana (Leininger y col. 2006; Shen y col. 2008; Jia y Conrad 2009). Basado en los análisis cuantitativos y cualitativos de estos microorganismos, está en discusión el papel de las AOA y AOB, y su contribución al proceso de nitrificación (Offre y col. 2009) y los factores ambientales que definen el nicho ecológico de cada una (Tuba y col. 2009).

4.3. Efecto del agua sobre la respuesta metabólica de la comunidad

Para comprender el papel que desempeñan los microorganismos en el ecosistema es necesario conocer los procesos metabólicos que ellos realizan (Marshall 1993). Una aproximación a estos estudios son los perfiles fisiológicos de la comunidad (CLPP), los cuales permiten hacer un análisis rápido y sensible de la diversidad metabólica de la microbiota, basado en la riqueza funcional de la comunidad (Preston-Mafham y col. 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la diversidad metabólica potencial fue mayor en el suelo semiárido que en el árido durante todos los tiempos analizados, tanto en el control como en los microcosmos tratados. Sin embargo, en los microcosmos de suelos áridos se observa que la adición de agua muestra un aumento en el número de fuentes de carbono utilizadas. El análisis de los CLPP mediante CCA indica que hay más diferencias entre los suelos que entre los tratamientos. Los factores edáficos que explicaron los agrupamientos observados fueron el pH y el contenido de MO. Estudios previos en microcosmos con estos suelos, tratados con nitrógeno, mostraron que el efecto del tratamiento sobre las comunidades microbianas fue menor que las diferencias entre los suelos y que los agrupamientos obtenidos pueden ser explicados también por el contenido de MO y el pH (Orlando, 2008). Este fenómeno se debería a que la magnitud de las diferencias entre tipos de suelo puede tener mayor impacto que la modificación de un factor abiótico, como el contenido hídrico (Lundquist y col. 1999; McLean y Huhta, 2000; Wilkinson y col. 2002; Guevara, 2007; Orlando, 2008). Investigaciones anteriores avalan la capacidad de los CLPP para discriminar en análisis espaciales y temporales el potencial metabólico de las comunidades microbianas (Garland y Mills, 1991; Garland, 1997; Orlando y col. 2007).

5. CONCLUSIONES

1. El incremento en la disponibilidad de agua produjo un aumento sustancial de la actividad nitrificante en suelo semiárido, y un aumento marginal en suelo árido. La actividad de nitrificación no estuvo asociada a un cambio en la diversidad genética de las bacterias oxidadoras de amonio.

2. La diversidad y abundancia de filotipos de bacterias oxidadoras de amonio no se vio influenciada por la adición periódica de agua. Ambos suelos presentaron los mismos fragmentos terminales (T-RFs), diferenciándose en su abundancia relativa. El análisis *in silico* de los T-RFs indicó la presencia de los géneros *Nitrospira* y *Nitrosomonas*.

3. Las comunidades microbianas de suelo semiárido fueron metabólicamente más activas que las de suelo árido durante todo el proceso. La adición periódica de agua aumentó la actividad metabólica en el suelo árido, pero no tuvo efecto apreciable sobre suelo semiárido.

4. La diferenciación de las comunidades microbianas a nivel metabólico, y de las AOB a nivel genético, fue influenciada por el tipo de suelo. En ambos casos el pH y la MO fueron los principales factores edáficos que explicaron las diferencias.

6. REFERENCIAS

Allison S.M., J.I. Prosser. 1991 Survival of ammonia oxidising bacteria in air-dried soil. *FEMS Microbiol Lett* 79: 65-68.

Amann R.I., W. Ludwig, K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169.

Arp D.J., L.A. Sayavedra-Soto, N.G. Hommes. 2002. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 178:250-55.

Atlas R.M., R. Bartha. 2001. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4^o Edición. Addison Wesley, Madrid.

Austin A.T., L. Yahdjian, J.M. Stark, J. Belnap, A. Porporato, U. Norton, D.A. Ravetta, S.M. Schaeffer. 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141:221-235.

Avrahami S., R. Conrad, G. Braker. 2002. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Appl Environ Microbiol* 68:5685-5692.

Avrahami S., B.J.M. Bohannan. 2007. Response of *Nitrosospira* sp. strain AF-like ammonia oxidizers to changes in temperature, soil moisture content, and fertilizer concentration. *Appl Environ Microbiol* 73:1166-1173.

Barns S.M., R.E. Fundyga, M.W. Jefferies, N. R. Pace. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1609-1613.

Begon M., J.L. Harper, C.R. Townsend. 1990. *Ecology. Individuals, populations and communities*. 2^o Edition. Blackwell Scientific Publications Inc, Cambridge.

Bell .C.W., N.E. McIntyre, S.B. Cox, D.T. Tissue, J.C. Zak. 2008. Soil microbial responses to temporal variations of moisture and temperature in a Chihuahuan Desert grassland. *Microb Ecol* 56:153-167.

Beman J.M., C.A. Francis. 2006: Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. *Appl Environ Microbiol* 72, 7767-7777.

Bernhard A.E., T. Donn, A.E. Giblin, D.A. Stal. 2005. Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environ Microbiol* 7:1289-1297.

Bhatnagar A., M. Bhatnagar. 2005. Microbial diversity in desert ecosystems. *Curr Sci* 89:91-100.

Bodelier P., J.A. Libochant, C. Blom, and H. Laanbroek. 1996. Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Appl Environ Microbiol* 62:4100-4107.

Bothe H., G. Jost, M. Schloter, B.B. Ward, K.P. Witzel. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev* 24:673-690.

Bottner P. 1985. Response of microbial biomass to alternate moist and dry conditions in a soil incubated with ¹⁴C and ¹⁵N-labelled plant material. *Soil Biol Biochem* 17:329-337.

Burton E.O., H.W. Read, M.C. Pellitteri, W.J. Hickey 2005. Identification of acylhomoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain Schmidt. *Appl Environ Microbiol* 71:4906-4909.

Chain P., J. Lamerdin, F. Larimer, W. Regala, V. Lao, M. Land, L. Hauser, A. Hooper, M. Klotz, J. Norton, L. Sayavedra-Soto, D. Arciero, N. Hommes, M. Whittaker, D. Arp. 2003. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 185:2759-2773.

Chávez M., M. Carú. 2006. Genetic Diversity of *Frankia* microsymbionts in root nodules from *Colletia hystrix* plants by sampling at a small-scale. *World J Microbiol Biotechnol* 22:813-820.

Chu H.Y., T. Fujii, S. Morimoto, X.G. Lin, K. Yagi, J.L. Hu, J.B. Zhang. 2007. Community structure of ammoniaoxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Appl Environ Microbiol* 73:485-491.

Córdova-Kreylos A.L., Y. Cao, P.G. Green, H.M. Hwang, K.M. Kuivila, M.G. Lamontagne, L.C. Van De Werfhorst, P.A. Holden, K.M. Scow. 2006. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. *Appl Environ Microbiol* 72:3357-3366.

Coolen M.J.L., B. Abbas, van J. Bleijswijk, E.C. Hopmans, M.M.M. Kuypers, S.G. Wakeham, J.S.S. Damste. 2007 Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environ Microbiol* 9:1001-1016.

De Boer W., G.A. Kowalchuk. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol Biochem* 33:853-866.

De Boer W., H.J. Laanbroek. 1989. Ureolytic nitrification at low pH by *Nitrospira spec.* *Arch Microbiol* 152:178-181.

Drees K.P., J.W. Neilson, J.L. Betancourt, J. Quade, D.A. Henderson, B.M. Pryor, R.M. Maier. 2006. Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama desert, Chile. *Appl Environ Microbiol* 72:7902-7908.

Dunbar J., White, S., Forney, L., 1997. Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias. *Appl Environ Microbiol* 63:1326-1331.

Dunbar J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R., 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *App Environ Microbiol* 67:190-197.

Ehleringer J.R. 2001. Productivity of deserts. In: Mooney HA, J Roy (Eds). *Primary productivity in terrestrial ecosystems*. Academic Press, San Diego. pp 345-362.

Espinosa F. 2007. Efecto del amonio sobre la composición y actividad de bacterias nitrificantes de la rizósfera y suelo sin cobertura vegetal. Seminario de Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 44 pp.

Farías F., J. Orlando, L. Bravo, R. Guevara, M. Carú. 2009. Comparison of soil bacterial communities associated with actinorhizal, non-actinorhizal plants and the interspaces in the sclerophyllous matorral from Central Chile in two different seasons. *J Arid Environ* 73:1117-1124.

Ferguson S.J. 1998. Nitrogen cycle enzymology. *Curr Opin Chem Biol* 2:182-193.

Ferroni G.D., J.S. Kaminski. 1980. Psychrophiles, psychrotrophs and mesophiles in an environment which experiences seasonal temperature fluctuations. *Can J Microbiol* 26:1184-1191.

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

Forster J.C. 1995. Soil Nitrogen. En: K. Alef & P. Nannipieri (Eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press Inc. San Diego, CA. pp. 79-87.

Francis C.A., Roberts K.J., Beman J.M., Santoro A.E., Oakley B.B. 2005. Ubiquity and diversity of ammoniaoxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14683-14688.

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

Gallardo A., W.H. Schlesinger. 1992. Carbon and nitrogen limitations of soil microbial biomass in desert ecosystems. *Biogeochemistry* 18:1-17.

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

Garland J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 24:289-300.

Gebauer R.L.E., J.R. Ehleringer. 2000. Water and nitrogen uptake patterns following moisture pulses in a cold desert community. *Ecology* 81:1415-1424.

Girvan M.S., J. Bullimore, J.N. Pretty, A.M. Osborn, A.S. Ball. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl Environ Microbiol* 69:1800-1809.

Groffman P.M., J.M. Tiedje. 1988. Denitrification hysteresis during wetting and drying cycles in soil. *Soil Sci Soc Am J* 52:1626-1629.

Guevara R. 2007. Diversidad Genética funcional y actividad de grupos microbianos relacionados al ciclo del nitrógeno en suelos con diferente cobertura vegetal. Tesis de Doctorado en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 171 pp.

Hasting R.C., C. Butler, I. Singleton, J.R. Saunders, A.J. McCarthy. 2000. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria populations in acid forest soil during conditions of moisture limitation. *Lett Appl Microbiol* 30:14-18.

He J.Z., J.P. Shen, L.M. Zhang, Y.G. Zhou, Y.M. Zheng, M.G. Xu, H. Di. 2007. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ Microbiol* 9:2364-2374.

Head I.M., W.D. Hiorns, T.M. Embley, A.J. McCarthy, J.R. Saunders. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonium oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol* 139:1147-1153.

Hedrick D.B., A. Peacock, J.R. Stephen, S.J. Macnaughton, J. Bruggemann, D.C. White. 2000. Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *J Microbiol Methods* 41:235-48.

Hooper A.B., D.M. Arciero, D. Bergmann, M.P. Hendrich. 2005. The oxidation of ammonia as an energy source in bacteria in respiration. In *Respiration in Archaea Bacteria*, ed. D Zannoni, pp. 121-47. Dordrecht, the Netherlands: Springer.

Hooper A.B., Vannelli T., Bergmann D.J., Arciero D. 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J Gen Mol Microbiol* 71:59-67.

Hooper D.U., L. Johnson. 1999. Nitrogen limitation in dryland ecosystems: responses to geographical and temporal variation in precipitation. *Biogeochemistry* 46:247-293.

Housman D.C., H.H. Powers, A.D. Collins, J. Belnap. 2006. Carbon and nitrogen fixation differ between successional stages of biological soil crusts in the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *J Arid Environ* 66:620-634.

Jia Z., R. Conrad. 2009. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environ Microbiol* 11:1658-1671.

Jiang Q.Q., L.R. Bakken. 1999. Comparison of *Nitrosospira* strains isolated from terrestrial environments. *FEMS Microbiol Ecol* 30:171-186.

Kandeler E., K. Deiglmayr, D. Tschirko, D. Bru, L. Philippot. 2006. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Appl Environ Microbiol* 72:5957-5962.

Kieft T.L., E. Srooker, M.K. Firestone. 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. *Soil Biol Biochem* 19:119-126.

Klotz M.G., D.J. Arp, P.S. Chain, A.F. El-Sheikh, L.J. Hauser, N.G. Hommes, F.W. Larimer, S.A. Malfatti, J.M. Norton, A.T. Poret-Peterson, L.M. Vergez, B.B. Ward. 2006. Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707. *Appl Environ Microbiol* 72:6299-6315.

Koops H.P., A. Pommerening-Röser. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol Ecol* 37:1-9.

Kowalchuk G.A., A.W. Stienstra, G.H.J. Heilig, J.R. Stephen, J.W. Woldendorp. 2000. Composition of communities of ammonium-oxidising bacteria in wet, slightly acid grassland soils using 16S rDNA-analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 31:207-215.

Kowalchuk G.A., J.R. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 55:485-529.

Kuske C.R., L.O. Ticknor, M.E. Miller, J.M. Dunbar, J.A. Davis, S.M. Barns, J. Belnap. 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in arid grassland. *Appl Environ Microbiol* 68:1854-1863.

Leininger S., T. Urich, M. Schloter, L. Scwark, J. Qi, G.W. Nicol, J.I. Prosser, S.C. Schuster, C. Schleper. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature Lett* 442:806-809.

Li W.T. 1981. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1085-1089.

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

Lundquist E, K. Scow, L. Jackson, S. Uesugi, C. Johnson. 1999. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input and organic farming systems to a wet/dry cycle. *Soil Biol Biochem* 31:1661-1675.

Madigan M., J. Martinko, J. Parker. 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8th edition. Prentice Hall Iberia, Madrid.

Manly B.F.J. 1994. *Multivariate statistical methods*. 2nd edition. Chapman & Hall, London.

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

Marsh T.L., P. Saxman, J. Cole, J. Tiedje. 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl and Environ Microbiol* 66:3616-3620.

Marshall K.C. 1993. Microbial ecology: whither goest thou? In: Guerrero R, C Pedros-Alio (Eds). *Trends in Microbial Ecology*. Spanish Society for Microbiology, Barcelona, España. pp. 5-8.

McCaig, A. E., T.M. Embley, J.I. Prosser. 1994. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiol Lett* 120:363-368.

McKay C.P., E.I. Friedmann, B. Gomez-Silva, L. Caceres-Villanueva, D.T. Andersen, R. Landheim. 2003. Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: four years of observations including the El Niño of 1997-1998. *Astrobiology* 3:393-406.

McLean M.A., V. Huhta. 2000. Temporal and spatial fluctuations in moisture affect humus microfungus community structure in microcosms. *Biol Fert Soils* 32:114-119.

Mendum T.A., R.E. Sockett, P.R. Hirsch. 1999. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the beta subdivision of the class proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. *Appl Environ Microbiol* 65:4155-4162.

Morales R, M. Leiva. 2006. Distribución y concentraciones críticas de material particulado en la ciudad de Santiago. En: Morales R (Ed). Contaminación atmosférica urbana. Episodios críticos de contaminación ambiental en la ciudad de Santiago. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. pp. 106-110.

Murrell J.C., Gilbert B., McDonald I.R. 2000. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch Microbiol* 173:325-332.

Nagy M.L., A. Perez, F. Garcia-Pichel. 2005. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert. *FEMS Microbiol Ecol* 54:233-245.

Nejidat A. 2005. Nitrification and occurrence of salt-tolerant nitrifying bacteria in the Negev desert soils. *FEMS Microbiol Ecol* 52:21-29.

Niklaus P.A., E. Kandeler, P.W. Leadley, B. Schmid, D. Tschlerko, C. Korner. 2001. A link between plant diversity, elevated CO₂ and soil nitrate. *Oecologia* 127:540-548.

Nicol G.W., S. Leininger, C. Schleper, J.I. Prosser. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol* 10:2966-2978.

Norton J.M., J.M. Low, M.G. Klotz. 1996. The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three nearly identical copies in *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol Lett* 139:181-188.

Noy-Meir I. 1973. Desert ecosystems: environment and producers. *Annu Rev Ecol Syst* 4:25-52.

Offre P., J.I. Prosser, G.W. Nicol. 2009. Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene. *FEMS Microbiol Ecol* 70:99-108.

OIES. Office for Interdisciplinary Earth Studies. 1991. Arid ecosystems interactions: recommendations for drylands research in the global change research program. OIES-Report 6:81.

Orlando J. 2008. Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre la diversidad genética y funcional de la microbiota bacteriana de suelos áridos. Tesis de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 114 pp.

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

Otter L., M. Scholes. 2005. Biogenic fluxes of carbon and nitrogen in arid and semi-arid ecosystems. *Geophys Res Abstr* 7:09593.

Peterjohn W.T., W.H. Schlesinger. 1991. Factors controlling denitrification in a Chihuahuan desert ecosystem. *Soil Sci Soc Am J* 55:1694-1701.

Preston-Mafham J., L. Boddy, P.F. Randerson. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon source utilization profiles - a critique. *FEMS Microbiol Ecology* 42:1-14.

Princic A., I. Mahne, F. Megusar, E.A. Paul, J.M. Tiedje. 1998. Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Appl Environ Microbiol* 64:3584-3590.

Prosser J.I., T.M. Embley, G. Webster. 2003. The influence of selection pressures on species 109 diversity, functional gene diversity and activity of ammonia-oxidizing bacteria. In: Hails RS, JE Beringer, HCJ Godfray (Eds). *Genes in the environment*. Blackwell Publishing, Oxford. pp. 187-202.

Pulleman M., A. Tietema. 1999. Microbial C and N transformations during drying and rewetting of coniferous forest floor material. *Soil Biol Biochem* 31:275-285.

Purkhold U., A. Pommerening-Röser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.P. Koops, M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol* 66:5368-5382.

Purkhold U., M. Wagner, G. Timmermann, A. Pommerening-Röser, H.P. Koops. 2003. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing-isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the *Nitrosomonads*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1485-1494

Ramsey P.W., M.C. Rillig, K.P. Feris, W.E. Holben, J.E. Gannon. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCRbased approaches. *Pedobiologia* 50:275-280.

Rösch C., H. Bothe. 2005. Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Appl Environ Microbiol* 71:2026-2035.

Rosselló-Mora R., P. Kämpfer. 2004. Defining microbial diversity: the species concept for prokaryotic and eukaryotic microorganisms. En: A.T. Bull (ed), *Microbial Diversity and Bioprospecting*. pp 29-39. ASM Press, Washington, D.C.

Ryan M.G., P. O'Toole, E.P. Farrell. 1998. The influence of drought and natural rewetting on nitrogen dynamics in a coniferous ecosystem in Ireland. *Environ Pollut* 102:445-451.

Sadzawka A., M.A. Carrasco, R. Grez, M.I. Mora. 2004. Métodos de análisis recomendados para los suelos Chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación, Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. pp 113.

Schimel D.S., W.J. Parton. 1986. Microclimatic controls of nitrogen mineralization and nitrification in shortgrass steppe soils. *Plant Soil* 93:347-357.

Schlesinger W. 1997. *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*. Academic Press Inc. London.

Shen J.P., L.M. Zhang, Y.G. Zhu, J.B. Zhang, J.Z. He. 2008. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol.* 10:1601-1611.

Shyu C., T. Soule, S.J. Bent, J.A. Foster, L.J. Forney. 2007. MiCA: A web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA Genes. *Microb Ecol* 53:562-570

Silyn-Roberts G., G. Lewis. 2001. In situ analysis of *Nitrosomonas spp.* in wastewater treatment wetland biofilms. *Wat Res* 35:2731-2739.

Singh J.S., A.K. Kashyap. 2006. Dynamics of viable nitrifier community, N-mineralization and nitrification in seasonally dry tropical forests and savanna. *Microbiol Res* 161:169-179.

Stark J.M., M.K. Firestone. 1995. Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. *Appl. Environ Microbiol* 61:218-221.

Stephen J.R., A.E. McCaig, Z. Smith, J.I. Prosser, T.M. Embley. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62:4147-4154.

Steubing L., R. Godoy, M. Alberdi. 2002. *Métodos de Ecología Vegetal*. 1^o Edición. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

Stursova M., C.L. Crenshaw, R.L. Sinsabaugh. 2006. Microbial responses to long-term N deposition in a semiarid grassland. *Microb Ecol* 51:90-98.

Ter Braak, C.J.F. 1990. Update notes: CANOCO version 3.10. Agricultural Mathematics Group, Wageningen.

Teske A., E. Elm, J.M. Regan, S. Toze, B.E. Rittmann, D.A. Stahl. 1994. Evolutionary relationships among ammonia and nitrite-oxidizing bacteria. *J Bacteriol* 176:6623-6630.

Torsvik V., J. Goksoyr, F.L Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:782-787.

Treusch A.H., S. Leininger, C. Schleper, A. Kietzin, H.-P. Klenk, S.C. Schuster. 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7:1985-1995.

Tuba H, N. Boon, L. Wittebolle, M. Marzorati, y col. .2009. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiol Rev* 33:855-869.

van Gestel M., R. Merckx, K. Vlassak. 1993. Microbial biomass responses to soil drying and rewetting: the fate of fast-and slow-growing microorganisms in soils from different climates. *Soil Biol Biochem* 25:109-123.

Venter J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, y col. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea. *Science* 304:66-74.

Waldrop M., M. Firestone. 2006. Seasonal dynamics of microbial community composition and function in oak canopy and open grassland soils. *Microb Ecol* 52:470-479.

Webster G., T.M. Embley, J.I. Prosser. 2002. Grassland management regimens reduce small scale heterogeneity and species diversity of β -proteobacteria ammonia oxidizer populations. *Appl Environ Microbiol* 68:20-30.

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

Wilkinson S., J. Anderson, S. Scardelis, M. Tisiafouli, A. Taylor, V. Wolters. 2002. PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. *Soil Biol Biochem* 34:189-200.

Whitby C.B., J.R. Saunders, R.W. Pickup, A.J. McCarthy. 2001. A comparison of ammoniaoxidiser populations in eutrophic basins of large freshwater lake. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 79:179-188.

Whittaker M., D. Bergmann, D. Arciero, A.B. Hooper. 2000. Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1459:346-355

Yang C.H., D.E. Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl Environ Microbiol* 66:345-351.

Yannarell A.C., E.W. Triplett. 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl Environ Microbiol* 71:227-239.

Yeager C.M., D.E. Northup, C.C. Grow, S.M. Barns, C.R. Kuske. 2005. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl Environ Microbiol* 71:2713-2722.

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

Zhou J., B. Xia, D.S. Treves, L.Y. Wu, T.L. Marsh, R.V. O'Neill, A.V. Palumbo, J.M. Tiedje. 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol* 68:326-334.

Zuñiga C. 2008 Composición de los gremios bacterianos del ciclo del nitrógeno en el suelo semiárido del matorral esclerófilo de Chile central. Seminario de Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 82 pp.