

UCH-FC  
MAG-B  
E 775  
C. 1



**"RESPUESTA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA TOTAL Y LA COMUNIDAD  
BACTERIANA METABÓLICAMENTE ACTIVA FRENTE A PULSOS DE  
PRECIPITACIÓN E INGRESO DE NITRÓGENO REACTIVO ÁCIDO AL SUELO"**

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

**MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Facultad de Ciencias**

**Por  
MARÍA FERNANDA ESPINOSA IPINZA  
Junio, 2010**

**Director de Tesis:  
Dra. MARGARITA CARÚ MARAMBIO**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

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

**MARÍA FERNANDA ESPINOSA IPINZA**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 14, de Junio, del 2010.

Director de Tesis:

Dra. Margarita Carú M.



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Nicolás Guiliani



Dr. Marcelo Baeza





*A mis amigos de laboratorio  
Gracias por su confianza y apoyo*

## Reseña



Nací en Santiago de Chile. La mayor parte de mis estudios primarios y la enseñanza media completa la realicé en el Colegio Las Condes, el que luego pasaría a llamarse Institución Teresiana. Entré a Bachillerato en la Universidad de Chile sin saber que estudiar, y así, sin tener mucha claridad aún, me cambié a Ingeniería en Biotecnología Molecular. Después de un par de años decidí cambiarme internamente a la carrera de Biología ambiental, carrera de la cual me titulé. Entré al laboratorio de Ecología microbiana, a cargo de la Dra. Margarita Carú a hacer mi tesis de pregrado, y luego de una interrupción, volví a hacer en este mismo laboratorio mi tesis de Magíster. Actualmente y paralelo al trabajo en la U, llevo 3 años desempeñándome como Bióloga asociada al laboratorio de análisis del Centro Nacional de Restauración y Conservación (CNCR/DIBAM), donde colaboro en los procesos de intervención y conservación patrimonial a través de análisis y aproximaciones biológicas, y por otro lado, participo en la formación de conservadores restauradores en la Universidad Internacional SEK dictando un curso de biología aplicada.

## Agradecimientos

Agradezco el apoyo de la profe, Dra. Margarita, que aceptó que volviera al laboratorio, aún cuando no tenía mucho tiempo. También por la oportunidad y la paciencia.

Agradezco especialmente a Julieta, por su gran ayuda siempre, por las discusiones, las mediaciones, el apoyo. Creo que sin su ayuda esta tesis aun estaría en algún lugar recóndito del ciberespacio. Gracias eñora!

Agradezco también la gran ayuda de Mauricio y Natalia, quienes trabajaron conmigo en la parte experimental de esta tesis, muchas gracias a los dos por que sin ustedes creo que me hubiera demorado muchísimo más. Gracias por el entusiasmo y la paciencia.

Agradezco a la reina del laboratorio, Juanita, y a la Cata, por estar ahí, por los almuerzos, por hacerme reír, por la compañía, las copuchas, y todas esas banalidades necesarias para hacer más entretenida la estadía.

A la Vale por hacerme reír tanto y a todos los demás, José, Gabriel, Marjorie, Marisol, Merly 8aunquenos vimos poco), por el apoyo y los buenos momentos.

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional, y sobre todo en esta oportunidad a Juancho por la paciencia, no es fácil aguantar el humor de alguien estresado, te quiero mucho.

Y por supuesto, al FONDECYT 1080280, por el apoyo económico para la realización de esta tesis.

## ÍNDICE DE MATERIAS



<b>LISTA DE TABLAS</b>	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS</b>	x
<b>RESUMEN</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Exposición del problema y antecedentes bibliográficos	1
Hipótesis	7
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
2.1. Diseño y montaje de los microcosmos	9
2.2. Técnicas moleculares	11
2.2.1. <i>Extracción de DNA</i>	11
2.2.2. <i>Amplificación del gen del rRNA 16S</i>	11
2.2.3. <i>Clonación y secuenciación</i>	12
2.2.4. <i>Perfiles de TRFLP</i>	13
2.3. Perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP)	17
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>19</b>
3.1. Determinación de la composición de la comunidad bacteriana del suelo	19
3.2. Efecto de los tratamientos sobre la diversidad genética de la comunidad bacteriana del suelo en los ensayos de microcosmos	24
3.2.1. <i>Efecto de la disponibilidad de agua</i>	24
3.2.2. <i>Efecto del nitrógeno reactivo ácido</i>	32
3.3. Relación entre los perfiles de TRFLP y la composición inicial de la comunidad	40
3.4. Efecto de los tratamientos en la diversidad metabólica de la comunidad microbiana del suelo en los ensayos de microcosmos	42
3.4.1. <i>Efecto de la disponibilidad de agua</i>	42
3.4.2. <i>Efecto del nitrógeno reactivo ácido</i>	47

<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>52</b>
4.1. Composición de la comunidad bacteriana del suelo semiárido proveniente del matorral esclerófilo	53
4.2. Relación entre la composición inicial de la comunidad y las variaciones de la diversidad genética durante la incubación de los microcosmos	55
4.3. Efecto de la disponibilidad de agua sobre la diversidad genética y metabólica de la comunidad bacteriana de suelo semiárido	58
4.4. Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno sobre la diversidad genética y metabólica de la comunidad bacteriana de suelo semiárido.	61
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>66</b>

ANEXO 1. Parámetros edáficos





## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Nomenclatura de los microcosmos según el tratamiento aplicado.	11
<b>Tabla 2.</b>	Partidores utilizados en las reacciones de PCR.	12
<b>Tabla 3.</b>	Análisis de similitud entre los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	27
<b>Tabla 4.</b>	Coefficientes de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los TRFLP en los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	28
<b>Tabla 5.</b>	Rango de riqueza (Rr) genética de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua basado en la abundancia de los TRFs.	30
<b>Tabla 6.</b>	Dinámica (Di) de cambio genético para los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	30
<b>Tabla 7.</b>	Análisis de similitud entre los microcosmos montados para determinar el efecto de Nr ácido.	35
<b>Tabla 8.</b>	Coefficientes de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los TRFLP en los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido	36
<b>Tabla 9.</b>	Rango de riqueza (Rr) basado en la abundancia de los TRFs de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	38
<b>Tabla 10.</b>	Dinámica (Di) de cambio para los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	38
<b>Tabla 11.</b>	Utilización de fuentes de carbono por categorías, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	44
<b>Tabla 12.</b>	Rango de riqueza (Rr) metabólico del microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	44
<b>Tabla 13.</b>	Dinámica (Di) metabólica de la comunidad en los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	44
<b>Tabla 14.</b>	Utilización de fuentes de carbono por categorías, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	48



<b>Tabla 15.</b>	Rango de riqueza (Rr) metabólico de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	48
<b>Tabla 16.</b>	Dinámica (Di) metabólica de la comunidad en los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Curva de Pareto-Lorenz derivada de tres patrones hipotéticos de perfiles genéticos.	16
<b>Figura 2.</b>	Electroforesis del DNA extraído del suelo de los microcosmos.	20
<b>Figura 3.</b>	Electroforesis de los amplicones del gen del rRNA 16S.	20
<b>Figura 4.</b>	Árbol filogenético de las secuencias obtenidas de suelo semiárido.	22
<b>Figura 5.</b>	Curva de rarefacción para los clones obtenidos a partir de suelo semiárido.	23
<b>Figura 6.</b>	Perfiles de TRFLP de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua, a los tiempos 0, 28, 56 y 84 de incubación.	26
<b>Figura 7.</b>	Dendrograma obtenido a partir de los datos de TRFLP para los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	27
<b>Figura 8.</b>	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP y los factores edáficos durante el tiempo de incubación de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	28
<b>Figura 9.</b>	Organización funcional, a nivel genético, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	31
<b>Figura 10.</b>	Gráfico 3D de los parámetros ecológicos dinámica (Di), rango de riqueza (Rr) y organización funcional (OF), a nivel genético, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	31
<b>Figura 11.</b>	Perfiles de TRFLP de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido, a los tiempos 0, 28, 56 y 84 de incubación.	34
<b>Figura 12.</b>	Dendrograma obtenido a partir de los datos de TRFLP para los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	35
<b>Figura 13.</b>	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP y los factores edáficos durante el tiempo de incubación de microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	36

<b>Figura 14.</b>	Organización funcional, a nivel genético, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	39
<b>Figura 15.</b>	Gráfico 3D de los parámetros ecológicos dinámica (Di), rango de riqueza (Rr) y organización funcional (OF), a nivel genético, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	39
<b>Figura 16.</b>	Frecuencia relativa de los principales grupos bacterianos durante la incubación de los microcosmos.	41
<b>Figura 17.</b>	Organización funcional, a nivel metabólico, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	46
<b>Figura 18.</b>	Gráfico 3D de los parámetros ecológicos dinámica (Di), rango de riqueza (Rr) y organización funcional (OF), a nivel metabólico, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.	46
<b>Figura 19.</b>	Organización funcional, a nivel metabólico, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	50
<b>Figura 20.</b>	Gráfico 3D de los parámetros ecológicos dinámica (Di), rango de riqueza (Rr) y organización funcional (OF), a nivel metabólico, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.	51

## LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS

<b>CH</b>	Contenido hídrico
<b>CCA</b>	Canonical Correspondence Analysis (Análisis de correspondencia canónica)
<b>CLPP</b>	Community-Level Physiological Profiling (Perfil fisiológico a nivel comunitario)
<b>CMD</b>	Community Metabolic Diversity (Diversidad metabólica de la comunidad)
<b>Di</b>	Dinámica
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
<b>dNTP</b>	Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxirribonucleótido trifosfato)
<b>MO</b>	Materia orgánica
<b>MVSP</b>	Multi-Variate Statistical Ppackage (Paquete de estadística multivariada)
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Información Biotecnológica)
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Contenido de amonio
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Contenido de nitrato
<b>Nr</b>	Nitrógeno reactivo
<b>OF</b>	Organización funcional
<b>ORP</b>	Potencial de óxido-reducción
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PS</b>	Peso seco
<b>Rr</b>	Rango de riqueza
<b>tAc</b>	Tratamiento con solución ácida (pH 4.0) sin nitrato de amonio
<b>tH<sub>2</sub>O</b>	Tratamiento con agua desionizada
<b>tNr</b>	Tratamiento con solución neutra de nitrato de amonio
<b>tNrAc</b>	Tratamiento con solución ácida (pH 4.0) de nitrato de amonio

<b>TRFLP</b>	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)
<b>TRF</b>	Terminal Restriction Fragment (Fragmento terminal de restricción)
<b>UF</b>	Unidades de fluorescencia
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (Método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética)

## RESUMEN

Las bacterias participan en el ciclado de los principales nutrientes y elementos en la Tierra. Aún así, en la mayoría de los estudios ecológicos las consideran como una caja negra, argumentando que son una constante en el funcionamiento del ecosistema y por lo tanto los cambios en la estructura de la comunidad no tendrían efecto en los procesos ecosistémicos. Dentro de los principales factores abióticos que se han descrito que afectan a la comunidad bacteriana cuentan la disponibilidad de agua, el pH y el contenido de nitrógeno. Por otra parte, se ha propuesto que los suelos áridos y semiáridos responderían tempranamente a perturbaciones abióticas. Sin embargo no se conoce mucho de la diversidad microbiana presente en estos suelos, lo cual los hace un sitio de estudio prioritario, en especial en Chile donde estas regiones cubren cerca del 22% del territorio nacional y pudieran poseer filotipos únicos. En este contexto, se evaluó el efecto de la disponibilidad de agua y del nitrógeno reactivo en condiciones ácidas sobre la diversidad y función de la comunidad bacteriana de suelos semiáridos. Para esto se construyeron microcosmos con suelo semiárido tratados con pulsos de agua cada 14 días (efecto de la disponibilidad de agua), solución ácida a pH 4.0 (efecto del ácido), solución neutra de nitrógeno reactivo (Nr) (efecto de Nr), solución ácida de Nr a pH 4.0 (efecto de Nr en condiciones ácidas), además de los respectivos controles sin tratamiento. Los microcosmos se incubaron por 84 días a 21°C, tomándose muestras para extracción de DNA cada 28 días para evaluar la diversidad genética mediante el polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal (TRFLP) y cada 42 días para evaluar la diversidad metabólica mediante perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP). Adicionalmente, se evaluó la composición de la comunidad bacteriana del suelo en estudio mediante clonación y secuenciación. Esta composición muestra una comunidad diversa,

mayoritariamente representada por proteobacterias y acidobacterias, no obstante cabe señalar que la mayoría de las secuencias obtenidas se agrupan principalmente con secuencias de organismos no cultivados. Por otra parte, el análisis de los perfiles de TRFLP, mediante dendrogramas de similitud, muestra que la adición de agua y Nr separa los microcosmos tratados de los controles. Esto también se observa para el análisis de correspondencia canónica en el cual se observa una divergencia de las muestras tratadas con pulsos de agua y con Nr respecto de sus controles que se explica por estos parámetros ambientales aplicados a los microcosmos. Al analizar la estructura genética de la comunidad, utilizando los parámetros ecológicos rango de riqueza (Rr), dinámica (Di) y organización funcional (OF), no se evidencian efectos de la disponibilidad de agua ni efecto del Nr en los microcosmos, lo cual difiere para los microcosmos tratados con soluciones ácidas, en los cuales se observan una disminución en el Rr con respecto del control. El análisis de los perfiles metabólicos revela que el tratamiento ácido también afecta a la comunidad, en este nivel reduciendo la dinámica. En conclusión, las perturbaciones aplicadas a la comunidad del suelo tienen efecto en la diversidad genética y funcional de la comunidad bacteriana. No obstante, cabe destacar que el efecto de una perturbación no siempre afecta directamente los componentes de la diversidad, por lo cual los datos deben ser analizados mediante distintos enfoques.

## ABSTRACT

Bacteria take part in the cycling of the main nutrients and elements in the Earth. Even then, in the most of ecological studies they are considered a black box, arguing that they are a constant in the ecosystem operation and for these reason changes in the community structure have not effects in ecosystem process. Within the main abiotic factors that have been described affecting the bacterial community are water availability, pH and nitrogen content. On the other hand, has been proposed that arid and semiarid soils could respond early to abiotic perturbations. Nevertheless, not much is known of the microbial diversity present in these soils which make these soils a priority study site, in special in Chile where these regions cover about 22% of the national territory and could have unique phlotypes. In this context, we evaluated the effect of water availability and reactive nitrogen in acidic conditions on the diversity and function of the bacterial community of semiarid soils. For this, semiarid soil microcosms were built treated with water pulses every 14 days (effect of water availability), acid solution at pH 4.0 (effect of acid), neutral solution of reactive nitrogen (Nr) (effect of Nr), acid solution of Nr at pH 4.0 (effect of Nr in acid conditions), in addition of the respective controls without treatment. The microcosms were incubated for 84 days at 21°C, taking samples for DNA extraction every 28 days to assess the genetic diversity through terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and every 42 days to asses the metabolic diversity by community level physiological profiling (CLPP). Additionally, we evaluated the bacterial community composition of the study soil by cloning and sequencing. This composition shows a diverse community, predominantly represented for members of proteobacteria and acidobacteria, however it should be noted that most



of the sequences obtained principally grouped with sequences of uncultivated organisms. On the other hand, the analysis of the TRFLP profiles, through dendrograms of similarity, show that the water and Nr addition separate the treated microcosms from the untreated ones. This is also noted for the canonical correspondence analysis, that reflecting a divergence of the samples treated with water pulses and Nr in respect of control groups due to these environmental parameters added to the microcosms. By analyzing the genetic structure of the community, using the ecological parameters range-weighted richness (Rr), dynamics (Dy) and functional organization (FO), not evident effects of availability water neither of Nr were observed, which differs for the microcosm treated with acidic solutions, where there is a diminution of the Rr. The analysis of metabolic profiles reveals that the acid treatment also affects the community, at this level reducing the dynamic. In conclusion, the applied perturbations to soil community have an effect in the genetic and functional diversity of the bacterial community. However, noteworthy that the effect of a disturbance is not always affect directly the components of the diversity, for this reason the data should be analyzed through different approaches.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los ciclos biogeoquímicos que controlan el reciclaje de los nutrientes y los elementos esenciales en la Tierra, están mediados principalmente por microorganismos. Las bacterias y arqueas contienen la mayoría del nitrógeno y el fósforo total y sobre la mitad del carbono fijado en los organismos vivos, y además la maquinaria metabólica de los microorganismos realiza numerosos y variados procesos ecosistémicos (Allison y Martiny, 2008). Estos procesos microbianos representan, a grandes rasgos, la mitad de la fotosíntesis y casi toda la descomposición de la materia orgánica, nitrificación, desnitrificación, producción de metano, entre otros (Schlesinger, 1997). Sin embargo, la microbiota involucrada en estos procesos se considera frecuentemente como una caja negra, desconociendo el papel de la estructura y composición de las comunidades microbianas en los ecosistemas, aún cuando las variaciones de la estructura y fisiología de la microbiota se supone que podrían tener un gran impacto sobre los ciclos biogeoquímicos globales (Schimel, 2004).

Considerar a los microorganismos como una caja negra implica suponer que ellos son una constante en el funcionamiento del ecosistema y por lo tanto los cambios en la composición de la comunidad no tendrían efecto en los procesos ecosistémicos. Esta suposición sería válida sólo si la comunidad es resistente, resiliente y/o redundante ante cualquiera perturbación. La comunidad es resistente cuando luego de una perturbación ni su estructura ni su función se ven afectadas; es resiliente cuando es capaz de recuperarse rápidamente y vuelve a su condición original; y es finalmente redundante funcionalmente cuando al producirse un cambio en su composición, el nuevo ensamble microbiano posee funciones

equivalentes a la comunidad original (Allison y Martiny, 2008).

Datos disponibles en la actualidad sugieren que las comunidades microbianas pueden ser consistentemente alteradas por diversas perturbaciones y que estos cambios pueden tener efecto en los ciclos biogeoquímicos y en la función del ecosistema (Horz y col., 2004). Para evaluar el impacto de una perturbación en el ecosistema es esencial caracterizar las comunidades microbianas que en él habitan, ya que cambios en la diversidad de éstas pueden afectar las diferentes funciones que realizan en el ecosistema (Calbrix y col., 2005). En este sentido, es necesario aclarar el concepto de diversidad, un concepto fundamental, complejo y general que abarca todo el espectro de organización biológica, desde genes hasta comunidades y sus componentes estructurales, funcionales y composicionales, así como las escalas de tiempo y espacio (Nuñez y col., 2003). Espinosa y Cordero (1995) definen la diversidad como composición en número y proporción de formas vivas en la naturaleza; involucra cualquier tipo de variabilidad en el mundo vivo: riqueza de especies, abundancia, funciones ecológicas, variabilidad genética y distribución geográfica diferencial de las especies, entre otros.

Se ha descrito que los suelos son uno de los componentes más importantes en los ecosistemas terrestres, los cuales son fisicoquímicamente complejos, con micro y macroagregados embebidos en una matriz líquida, sólida y gaseosa que cambia continuamente en respuesta a perturbaciones tanto de origen natural, como antrópico. En esta matriz la diversidad microbiana es concebida como el atributo funcional del ecosistema, la cual se ve directamente influenciada por los cambios en su matriz fisicoquímica (Coleman y col., 2005). Tomando a la matriz de suelo como una entidad en continuo cambio, los principales factores abióticos que se describen que afectan a las comunidades del suelo son el pH, la disponibilidad de

agua y el contenido de nitrógeno.

El pH es considerado a nivel global el mejor descriptor de la diversidad de los ensamblajes microbianos, siendo los suelos con pH neutro los más diversos y disminuyendo la diversidad con un aumento de la acidez (Fierer y Jackson, 2006).

Varios reportes indican que la disponibilidad de agua afecta la biomasa (Bottner, 1985; Kieft y col., 1987; Van Gestel y col., 1993), la composición microbiana (Drees y col., 2006) y la abundancia de la microbiota (Singh y Kashyap, 2006). Además, hay numerosas evidencias que muestran que el contenido hídrico afecta las funciones microbianas tales como la fijación de nitrógeno (Housman y col., 2006), la mineralización de carbono y nitrógeno (Seneviratne y Wild, 1985; Degens y Sparling, 1995; Singh y Kashyap, 2006), la nitrificación (Singh y Kashyap, 2006) y la desnitrificación (Groffman y Tiedje, 1988; Peterjohn y Schlesinger, 1991), entre otros, lo cual afecta el reciclaje de los nutrientes (Schimel y Parton, 1986; Gebauer y Ehleringer, 2000). Por otra parte, Zhou y col. (2002) sugieren que un bajo contenido hídrico puede explicar la mayor diversidad microbiana observada en suelos con bajo contenido de carbono. Según estos autores la falta de agua limitaría la comunicación entre micro-hábitats dentro de la matriz del suelo, resultando en una mayor heterogeneidad espacial que disminuye o anula el efecto de la competencia. Además, en estos suelos con un bajo contenido de carbono, las poblaciones microbianas podrían evitar la competencia al permanecer aisladas y en bajo número, usando recursos que son escasos pero, probablemente, heterogéneos. Estas condiciones permitirían el mantenimiento de comunidades más diversas y equitativas.

El nitrógeno disponible también se considera un factor limitante para el desarrollo de las comunidades microbianas en diferentes suelos (Hooper y Johnson, 1999; Ehleringer, 2001). El creciente interés por los problemas ambientales ha puesto especial atención sobre la precipitación de nitrógeno reactivo (Nr) atmosférico ya que la intervención antropogénica ha generado un aumento de la producción de formas combinadas de Nr las cuales son dispersadas por procesos de transporte hidrológico y atmosférico, acumulándose en los ecosistemas debido al desbalance entre la generación de Nr (fijación biológica, fuentes antropogénicas) y su remoción vía desnitrificación. Como Nr se consideran todas las formas reducidas y oxidadas de nitrógeno inorgánico, además de compuestos orgánicos nitrogenados. El ingreso de Nr también contribuye a la generación de problemas ambientales como acidificación, fertilización y eutrofización de diferentes ecosistemas (Vitousek y col., 1997; Galloway y col., 2003). La precipitación del Nr también puede resultar en una saturación de nitrógeno, una condición donde la disponibilidad del nutriente inorgánico excede la demanda de las plantas y microorganismos (Aber y col., 1991). Esta saturación produce cambios en el estado químico del suelo y la función de la comunidad, resultando en desequilibrios en el reciclaje de nutrientes y la productividad del ecosistema (Adams, 2003). La precipitación crónica de Nr ha reducido significativamente la riqueza de especies vegetales, un importante componente de la biodiversidad, considerándose como una de las causas de la extinción de especies (Sala y col., 2000; Stevens y col., 2004). Además, existen antecedentes que indican que hay efectos directos e indirectos mediados por un aumento de precipitación ácida de nitrógeno sobre el tamaño, composición, y actividad de microorganismos en suelos forestales y agrícolas (Bewley y Stotzky, 1983; Prescott y Parkinson, 1985; Pennanen y col., 1998).

Por otra parte, se ha postulado que los suelos de regiones áridas y semiáridas se encuentran entre los sistemas que más tempranamente responderían a los efectos de las perturbaciones debido a que los procesos ecosistémicos en ellos están estrechamente acoplados a las precipitaciones (OIES 1991). Los ecosistemas áridos son altamente vulnerables a las perturbaciones antropogénicas como consecuencia del cambio en el uso del suelo (Charney y col., 1975), la pérdida de nutrientes (Evans y Belnap, 1999), la disminución de la vegetación, el aumento de la erosión, la invasión de especies exóticas y la pérdida de especies nativas (Brown y col., 1997). Se ha descrito que la naturaleza episódica de la disponibilidad de agua en estos ecosistemas tiene consecuencias significativas en el reciclaje de carbono y nitrógeno, produciéndose una rápida respuesta de la comunidad microbiana al aumento de humedad, lo que finalmente se traduce en cambios en los balances de inmovilización y mineralización (Austin, 2004). En Chile, las regiones áridas y semiáridas cubren una superficie aproximada de 16,5 millones de hectáreas, las cuales representan el 22% del territorio nacional. Entre estas regiones, el matorral esclerófilo de Chile central es un ejemplo de suelo semiárido, el cual abarca desde los 32°S hasta los 36°S (Gajardo, 1994).

En general, hay escasa o nula información sobre el efecto del ingreso de  $N_r$  y la disponibilidad de agua sobre la diversidad genética y funcional de la microbiota de ecosistemas semiáridos, porque generalmente se considera que el ciclo del nitrógeno en estos suelos está limitado, debido principalmente a la reducida actividad microbiana, como consecuencia del bajo contenido hídrico (Otter y Scholes, 2005). Varios autores sugieren que a escala regional, la baja disponibilidad de nitrógeno sumado a la falta de agua puede contribuir a limitar la productividad primaria neta en ecosistemas áridos y semiáridos (Fisher y col., 1988; Gutiérrez y col., 1992, Burke y col., 1997; Belnap, 2001; Austin y Sala, 2002). En

los suelos semiáridos, como el matorral esclerófilo cercano a Santiago, la incorporación de nitrógeno ocurre en parte por fijación biológica de nitrógeno de bacterias diazótrofes de vida libre y simbióticas (Carú y col., 2003; Chávez y Carú, 2006), pero por su cercanía a un centro urbano con una alta contaminación atmosférica (CENMA, 2002; Koutrakis y col., 2005), estos suelos también estarían expuestos a una precipitación crónica de Nr ácido que puede afectar su calidad ya sea por saturación de nitrógeno o por acidificación. En este escenario se ha descrito que la acumulación de nutrientes en el suelo como consecuencia de la mineralización, causada por pulsos de agua, puede subsecuentemente afectar la dinámica funcional y alterar la diversidad de la comunidad bacteriana (Bell, 2008).

Por otro lado, el estudio de comunidades bacterianas ha estado limitado por la dificultad de cultivar estos organismos (Kowalchuk y Stephen, 2001). En la actualidad existen diversas estrategias independientes de cultivo para estudiar a las bacterias en sus ambientes naturales, especialmente aquellas que aún no se cultivan (Bothe y col., 2000). Las aproximaciones para el estudio de la composición y diversidad bacteriana se basan principalmente en técnicas moleculares. Coleman y col. (2005) sugieren que el desarrollo de estas herramientas y la implementación de técnicas de secuenciación de DNA han facilitado enormemente la identificación de nuevos taxos. Por ejemplo, los autores señalan que de 53 *phylums* descritos en base a sus secuencias, sólo 27 han sido cultivados.

Una de las técnicas independientes de cultivo usadas para comparar comunidades microbianas son los perfiles de TRFLP (polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal) (Liu y col., 1997; Marsh y col., 2000). Este método se basa en la resolución de amplicones de similar tamaño, pero que difieren en secuencia y por lo tanto generan fragmentos de diferente largo luego del

tratamiento con enzimas de restricción. El perfil de TRFLP de una comunidad microbiana es una representación semi-cuantitativa de la distribución de secuencias (riqueza) y fluorescencia relativa (abundancia) presente en la muestra (Yeager y col., 2005). Este análisis ha demostrado ser una técnica independiente de cultivo reproducible, de alta resolución y rendimiento para monitorear efectos ambientales y antropogénicos en la estructura de la comunidad (Moeseneder y col., 1999; Tiedje y col., 1999; Dunbar y col., 2000; Osborn y col., 2000; Braker y col., 2001; Buckley y Schmidt, 2001; Casamayor y col., 2002; Pesaro y col., 2004; Graff y Conrad, 2005; Hartmann y col., 2005, 2006; Widmer y col., 2006).

De acuerdo a estos antecedentes, se pretende evaluar si un aumento en la disponibilidad de agua y la precipitación de nitrógeno reactivo en condiciones ácidas, modifica la diversidad y función de la comunidad bacteriana del suelo. Para esto, se plantea la siguiente **Hipótesis**: "Dado que entre los principales factores que afectan la comunidad bacteriana de suelos semiáridos está la disponibilidad de agua, el pH y el nitrógeno, entonces la precipitación ácida de nitrógeno reactivo, producirá alteraciones en la diversidad y función de la comunidad bacteriana de estos suelos".

Para abordar este problema se realizaron ensayos de microcosmos con suelos semiáridos derivados del matorral esclerófilo de Chile central (Región Metropolitana). La microbiota de estos suelos puede ser especialmente sensible a los factores ensayados debido a su menor abundancia y actividad, comparada con suelos forestales y agrícolas. Además, las comunidades microbianas de suelos semiáridos podrían ser menos complejas y los grupos funcionales menos redundantes.



El **Objetivo General** de esta tesis fue determinar el efecto de la disponibilidad de agua y el nitrógeno reactivo ácido, sobre la diversidad y función de la comunidad bacteriana de suelos semiáridos, mediante ensayos de microcosmos.

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

1. Identificar los filotipos predominantes en la comunidad bacteriana del suelo mediante clonación y secuenciación del gen del rRNA 16S.
2. Determinar el efecto de la disponibilidad de agua y el nitrógeno reactivo ácido sobre la diversidad genética de la comunidad bacteriana del suelo, mediante patrones de T-RFLP.
3. Determinar el efecto de los tratamientos estudiados sobre la función de la comunidad bacteriana del suelo, mediante perfiles fisiológicos a nivel de la comunidad.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Diseño y montaje de los microcosmos

Los microcosmos se prepararon a partir de una muestra compuesta de suelo semiárido, del matorral esclerófilo proveniente de la localidad "El Romeral" (33°48'S, 70°14'W), Cajón del Maipo, Región Metropolitana, Chile. El sector presenta un clima Mediterráneo seco con precipitaciones invernales con un promedio anual de 350 mm.

Del sitio indicado se tomaron 10 muestras del horizonte superficial del suelo a 15 cm de profundidad en una superficie de aproximadamente 10 x 10 m. Las muestras se homogeneizaron, se cernieron y mezclaron, para obtener una muestra compuesta con el objetivo de reducir la heterogeneidad espacial a pequeña escala según lo descrito por Webster y col. (2002) y Girvan y col. (2003).

Los microcosmos se construyeron a partir de la muestra compuesta de suelo en recipientes plásticos en una relación 1:3 (v:v) suelo:aire y se incubaron a 21°C durante 84 días. Todos los microcosmos se montaron por triplicado y los tratamientos consistieron en lo siguiente:

#### A.- Efecto de la disponibilidad de agua (tratamiento 2x1)

- i) R-s/t: Control A (sin adición de agua)
- ii) R-tH<sub>2</sub>O(14): Tratamiento con agua (adición de agua desionizada en pulsos cada 14 días).

B.- Efecto del nitrógeno reactivo ácido (tratamiento de 2x2)

- iii) R-tH<sub>2</sub>O: Control B (adición de agua desionizada al inicio de la incubación)
- iv) R-tAc: Tratamiento ácido (adición de una solución ácida (pH 4.0) al inicio de la incubación)
- v) R-tNr: Tratamiento con Nr (adición de solución de nitrato de amonio (100  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) al inicio de la incubación)
- vi) R-tNrAc: Tratamiento con Nr ácido (adición de una solución ácida (pH 4.0) de nitrato de amonio (100  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) al inicio de la incubación)

Cabe señalar que los tratamientos fueron aplicados para evaluar el efecto de factores que afectan la biodiversidad en suelos, y que en ningún caso buscan replicar las condiciones del lugar de muestreo.

En la tabla 1 se muestra la nomenclatura aplicada a cada microcosmos. Todos los tratamientos se aplicaron hasta alcanzar el 60% de la capacidad de retención de agua del suelo, este porcentaje de riego asegura un efecto de la perturbación aplicada sobre la microbiota del suelo sin perder la oxigenación. Se tomaron las siguientes submuestras de los microcosmos:

Cada 7 días para la determinación de parámetros edáficos.

Cada 28 días para la purificación de DNA y determinación de la diversidad genética.

A los 0, 42 y 84 días para la determinación de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP).

**Tabla 1.** Nomenclatura de los microcosmos según el tratamiento aplicado

Tratamiento	Nomenclatura
Control A: sin adición de agua	R-s/t
Tratamiento 1: Tratamiento con agua cada 14 días	R-tH <sub>2</sub> O(14)
Control B: adición de agua al inicio de la incubación	R-tH <sub>2</sub> O
Tratamiento 2: Tratamiento ácido al inicio de la incubación	R-tAc
Tratamiento 3: Tratamiento con Nr al inicio de la incubación	R-tNr
Tratamiento 4: Tratamiento con Nr ácido al inicio de la incubación	R-tNrAc

## 2.2. Técnicas moleculares

### 2.2.1. Extracción de DNA

El DNA total de las muestras se obtuvo a partir de 0,25 g de suelo empleando el kit de extracción "UltraClean Soil DNA" (MoBio Laboratories®) según las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido se visualizó en geles de agarosa al 0,8% en solución tampón TAE 1X teñidos con bromuro de etidio (0,5 ug/ml) y se almacenó a -20°C.

### 2.2.2. Amplificación del gen del rRNA 16S

Para la determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana se amplificó el gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los partidores universales fD1 y rP2 (Tabla 2). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 µl que contenía GoTaq® Green Master Mix (GoTaq® DNA Polimerasa en amortiguador de reacción 1X Green GoTaq® (pH 8,5), 200 µM de cada dNTP y 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Promega®) y los partidores antes mencionados a una

concentración de 200 nM cada uno. El programa de amplificación fue el siguiente: una etapa inicial de 3 min a 94°C seguida por 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 57°C y 2 min a 72°C. Finalmente se realizó una extensión de 20 min a 72°C.

La amplificación de DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en solución tampón TAE 1X teñidos con bromuro de etidio (0,5 ug ml<sup>-1</sup>), visualizados bajo luz UV.

**Tabla 2.** Partidores utilizados en las reacciones de PCR.

Gen	Partidores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (bp)	Referencia
rDNA 16S	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1504	Weisburg y col., 1991
	rP2	ACGGCTACCTTGTACGACTT		

### 2.2.3. Clonación y secuenciación

Los amplicones derivados del gen del rRNA 16S fueron clonados mediante el InstAclone™ PCR Cloning Kit" (Fermentas®) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los clones fueron secuenciados en un secuenciador ABI 1.6.0 (Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur). La identidad de las secuencias se evaluó utilizando el programa BLASTN (Altschul y col., 1997).

Las secuencias de referencia utilizadas en las filogenias se obtuvieron de la base de datos del GenBank y se alinearon en ClustalX v 1.81 (Thompson y col., 1997). El árbol filogenético se realizó con el programa MEGA 4 (Tamura y col., 2007) usando la distancia genética de Jukes & Cantor (1969) y el algoritmo de agrupamiento Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987).

Para evaluar la representatividad de la librería de clones y la cobertura sobre la diversidad del suelo en estudio, se realizó una curva de rarefacción usando los programas Clusterer (Klepac-Ceraj y col., 2006) y Analytical Rarefaction (Holland, 2003). Para calcular el número de clones y de grupos necesarios para obtener una genoteca representativa de la comunidad de suelo, se ajustó la curva a una distribución bimodal usando el programa GraphPad Prism versión 4 (GraphPad Software, Inc.). Finalmente se calculó el % de cobertura (Cx) de la librería usando la fórmula:  $Cx = (1 - (Nx/N)) * 100$ ; donde Nx es el número de secuencias únicas y N el total de secuencias analizadas.

#### 2.2.4. Perfiles de TRFLP

Para la obtención de los perfiles de TRFLP, la reacción de PCR se realizó con los partidores universales descritos en la Tabla 2, usando el partidor fD1 marcado en el extremo 5' con el fluoróforo FAM (5-carboxifluoresceína). Las condiciones de amplificación y de verificación usadas son las mismas que las mencionadas en el punto 2.2.2.

Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *HaeIII* y *MspI* (Fermentas®). Para generar los perfiles de TRFLP, los fragmentos terminales producidos por la digestión enzimática fueron resueltos en un secuenciador automático (Applied Biosystem Instruments ABI) (Liu y col., 1997; Blackwood y col., 2003) usando un servicio de tipificación (DNA Genotyping Service, Iowa State University of Science and Technology, Iowa, EEUU). La longitud de los TRFs marcados se determinó por comparación con un estándar interno empleando el Programa GeneScan (ABI).

El análisis de filotipos se realizó a partir de los datos arrojados por el secuenciador del largo del fragmento en pares de bases (riqueza) y las unidades de fluorescencia registradas para cada fragmento (abundancia). Estos datos se tradujeron a una matriz binaria de presencia ausencia. La similitud entre las muestras fue estimada mediante el índice de similitud de Jaccard y el algoritmo de agrupamiento UPGMA (Unweighted pairs group method with arithmetic average) (Li, 1981). El dendrograma fue obtenido usando el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK). Utilizando el mismo programa, se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA), para relacionar los perfiles de TRFLP, considerando la abundancia relativa de cada TRF, con los parámetros edáficos obtenidos a partir del suelo correspondiente a cada tratamiento. Las variables edáficas utilizadas fueron contenido hídrico (CH), materia orgánica (MO), pH, potencial de óxido-reducción (ORP), contenido de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y contenido de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Anexo 1). Los agrupamientos se corroboraron estadísticamente usando un análisis de similitud (ANOSIM) para los dendrogramas y el test de Montecarlo para los CCA. El análisis de similitud entrega un R, el cual tiene valores cercanos a 0 cuando las diferencias entre grupos son menores que las intragrupos, y máximo de 1 cuando estas diferencias son mayores entre los grupos. El R se calculó usando el programa ANOSIM (Clarke, 1993). El Test de Montecarlo se utiliza para explicar variabilidad en un conjunto de datos dado por otro conjunto de datos, lo cual es entendido como ordenaciones limitadas por variables explicativas. El significado estadístico ( $p < 0,05$ ) de la relación entre la diversidad genética y cada parámetro edáfico del CCA se obtuvo a través de la prueba de MonteCarlo con 1000 permutaciones de la matriz, bajo el modelo completo con el programa CANOCO 4 (Ter Braak y Smilauer, 1988). De la misma manera se determinó el valor estadístico individual del eje canónico 1 (CCA1) y de la totalidad de los ejes canónicos.

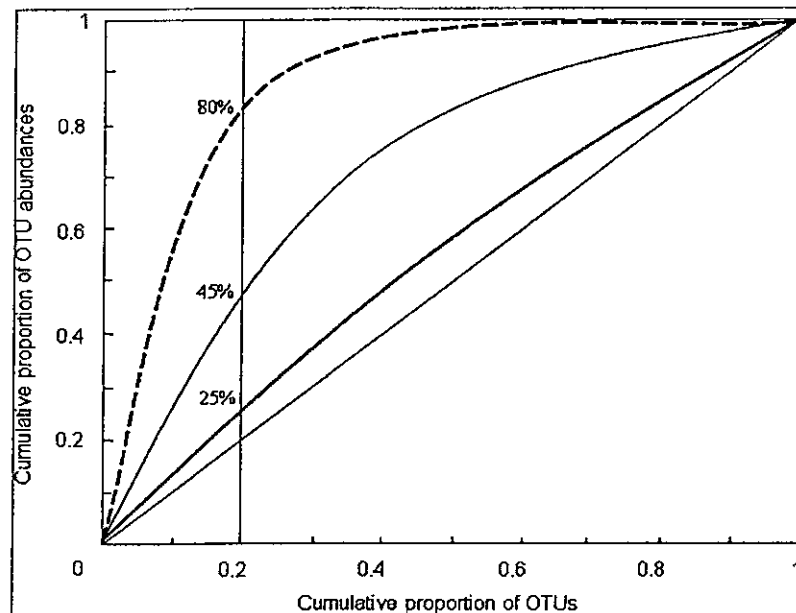
Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la comunidad bacteriana del suelo, se determinaron los siguientes parámetros ecológicos: el rango de riqueza (Rr), la dinámica (Di) y la organización funcional (OF) de la comunidad en base a los fragmentos terminales de restricción (TRFs) obtenidos en cada muestra (Marzorati y col., 2008). El Rr refleja la capacidad de carga de un ambiente, cuán habitable es. Este parámetro se calculó en base a la cantidad de TRFs obtenidos (N) y a la cobertura que tienen estos TRFs en relación al rango máximo detectable de acuerdo al marcador de tamaño molecular utilizado (1000 pb) (R), según la fórmula:  $Rr = N \times R$ .

La Di fue evaluada en relación al número de TRFs que se mantienen entre dos tiempos consecutivos durante la incubación de los microcosmos, de esta manera se puede establecer el porcentaje de cambio del perfil como: % cambio =  $100 - \% \text{ similitud}$ . Dado que la tasa de cambio se evaluó entre los intervalos 0-28, 28-56 y 56-84, se hizo un promedio de estos tres valores para obtener la tasa de cambio total que representa la dinámica neta de la comunidad.

La OF describe el nivel de especialización que alcanza una comunidad, así una comunidad microbiana con baja OF (curva 25%, Figura 1) sería aquella que posee una gran diversidad de filotipos conviviendo en un mismo ambiente sin presiones de selección, una comunidad con OF media (curva 45%, Figura 1) se presenta cuando disminuye el número de filotipos presente, y finalmente una comunidad con alta OF (curva 80%, Figura 1) corresponde a aquella que tiene unos pocos filotipos dominantes. Para calcular este índice, los TRFs se ordenaron, en término de su abundancia, de mayor a menor y se evaluó qué porcentaje de la



comunidad total correspondía al 20% de filotipos, de acuerdo a la curva de abundancia de Pareto-Lorenz (PL) (Marzorati y col., 2008).



**Figura 1.** Curva de Pareto-Lorenz derivada de tres patrones hipotéticos de perfiles genéticos. Describe las 3 situaciones posibles de organización funcional de una comunidad: alta (curva 80%), media (curva 45%) y baja (curva de 25%). Tomada de Marzorati y col. (2008).

Para visualizar los resultados obtenidos para Rr, Di y OF se establecieron rangos de jerarquía para cada resultado en bajo, medio, y alto. Esta jerarquización permitió graficar tridimensionalmente los datos según lo propuesto por Marzorati y col. (2008).

Finalmente, para contrastar los resultados obtenidos por clonación con los patrones de TRFLP, se hizo una digestión *in silico* de las secuencias de los clones obtenidas utilizando el programa informático Bioedit Sequence Alingment Editor versión 7.0.5.2 (Hall, 1999). Los principales TRFs obtenidos *in silico* fueron

comparados con los obtenidos por TRFLP para identificar los posibles biotipos presentes en los microcosmos.

### 2.3. Perfil fisiológico a nivel de la comunidad (CLPP)

Para evaluar la diversidad metabólica potencial de la comunidad microbiana se determinaron perfiles metabólicos por el método BIOLOG usando EcoPlate™ que permite detectar la utilización de 31 fuentes de carbono (Garland y Mills, 1991). Para esto se suspendió 1 g de suelo en 9 ml de de PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), se agitó toda la noche, luego se filtró la suspensión y se inocularon en cada pocillo 100 µl de la suspensión filtrada y las placas se incubaron a 21°C. El desarrollo de color en los pocillos individuales fue registrado durante 7 días cada 24 horas utilizando un lector de placas automático a 590 nm. La absorbancia en el blanco con agua fue sustraída de la lectura de cada pocillo experimental.

Para comparar la utilización de sustratos de cada microcosmos se analizó el porcentaje de fuentes de carbono utilizadas, separando los 31 sustratos en: aminas/amidas, aminoácidos, carbohidratos, ácidos carboxílicos, sustancias misceláneas y polímeros (Preston-Mafham y col., 2002).

Finalmente para comparar la diversidad metabólica con la diversidad genética, los datos de utilización de fuentes de carbono se utilizaron para calcular el rango de riqueza (Rr), la dinámica (Di) y la organización funcional (OF) de cada comunidad como se describe en el punto 2.2.4. En este caso el Rr se calculó en base a las fuentes utilizadas (N) y al % de cobertura de las 31 fuentes posibles (R), la Di se evaluó en torno a las fuentes utilizadas entre tiempos consecutivos y la OF

se determinó como la absorbancia acumulada asociada a las fuentes de carbono usadas respecto del total de fuentes disponibles.

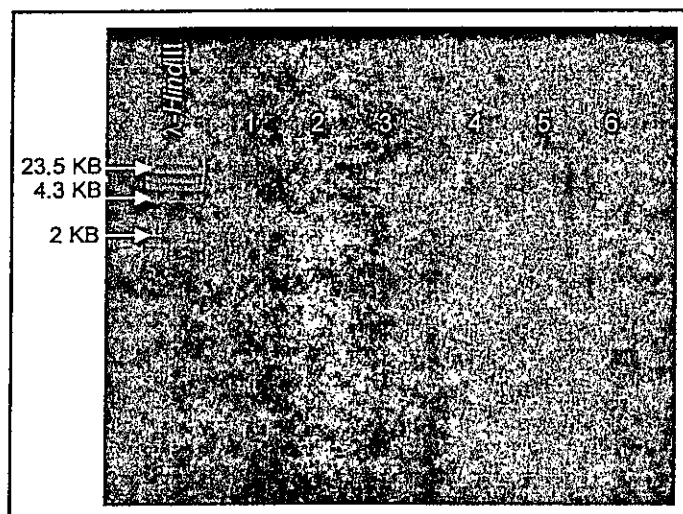
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinación de la composición de la comunidad bacteriana del suelo

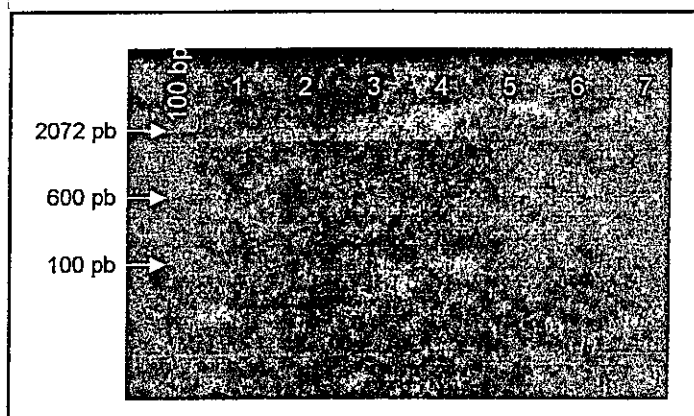
Para determinar los grupos bacterianos predominantes en la comunidad bacteriana del suelo utilizado en los ensayos de microcosmos, se realizó una aproximación molecular independiente de cultivo. El DNA se purificó directamente de la muestra de suelo y la diversidad de filotipos se determinó mediante la amplificación y clonación del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S.

El DNA purificado a partir del suelo de los microcosmos fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa (Figura 2). La preparación obtenida contiene DNA de alto peso molecular que indica que es adecuado para la amplificación mediante PCR.

Los productos de la amplificación por PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%. La Figura 3 muestra que la banda de amplificación corresponde a fragmentos de aproximadamente 1500 pb, por comparación con el marcador de peso molecular.



**Figura 2.** Electroforesis del DNA extraído del suelo de los microcosmos. El DNA se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Pocillos 1, 2 y 3, microcosmos R-tH20(14) t0; pocillos 4, 5 y 6, control A, R-s/t t0. El primer carril contiene el marcador de tamaño molecular  $\lambda$ -HindIII (Promega®).



**Figura 3.** Electroforesis de los amplicones del gen del rRNA 16S. El DNA se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%. Pocillos 1 y 2, diluciones 1/20 y 1/70 de R-tH20 t28, respectivamente; pocillo 3, R-tNrAc t56 directa; pocillos 4 y 5, R-tNrAc t28, diluciones 1/20 y 1/70, respectivamente; pocillos 6 y 7, R-tNrAc t28, diluciones 1/20 y 1/70, respectivamente. El primer carril contiene el marcador de tamaño molecular 100 bp (Promega®).

Los amplicones obtenidos de la reacción de PCR del gen del rRNA 16S se clonaron mediante el InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas®) para determinar los filotipos más abundantes en la muestra del suelo semiárido utilizada para la construcción de los microcosmos. La identidad de las secuencias obtenidas fue analizada con la herramienta BLASTn (Altschul y col., 1997) disponible en la web (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De un total de 125 clones, más del 90% de las secuencias obtenidas se alinearon con clones aislados de otras muestras ambientales, principalmente de suelo y rizósfera.

Las secuencias de organismos cultivados descargadas de la base de datos, más las obtenidas para los clones, se alinearon en ClustalX v1.81 (Thompson y col., 1997), y se realizó un árbol filogenético utilizando la distancia genética de Jukes & Cantor (1969) y el algoritmo de agrupamiento Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) en el programa MEGA4 (Tamura y col., 2007). En la Figura 4 se puede observar el agrupamiento de las secuencias de los clones con las secuencias obtenidas de la base de datos. Se observa una gran dispersión y diversidad de las secuencias obtenidas en los diferentes grupos microbianos. Éstas se distribuyen en 7 linajes: proteobacterias, acidobacterias, actinobacterias, firmicutes, bacteroidetes, gemmatimonadetes y verrucomicrobia. La mayor abundancia de clones se encontró en el grupo de las proteobacterias que abarca al 25,6% de las secuencias obtenidas y acidobacterias que representa un 14,4% del total. Los grupos menos representados corresponden a gemmatimonadetes y verrucomicrobia, con un total de 4,8% y 3,2%, respectivamente.

Para estimar la cobertura de la librería de clones sobre la diversidad de organismos en el suelo, se construyó una curva de rarefacción (Figura 5). Se observa que en base al número de clones y su distribución en los grupos, se está lejos de alcanzar la cantidad de clones necesarios para describir la diversidad de organismos de este suelo, ya que no se observa un achatamiento pronunciado en la curva. Utilizando el programa GraphPad Prism versión 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) se estimó el número de clones y grupos necesarios para cubrir la diversidad de este suelo, ajustando la curva a una distribución bimodal. Se obtuvo que se necesitan 1377 clones para cubrir la diversidad del suelo en estudio. Además se calculó la cobertura del muestreo de la librería, teniendo 112 secuencias únicas y 125 clones, se obtuvo que la librería cubre cerca de un 10,4% de la diversidad.

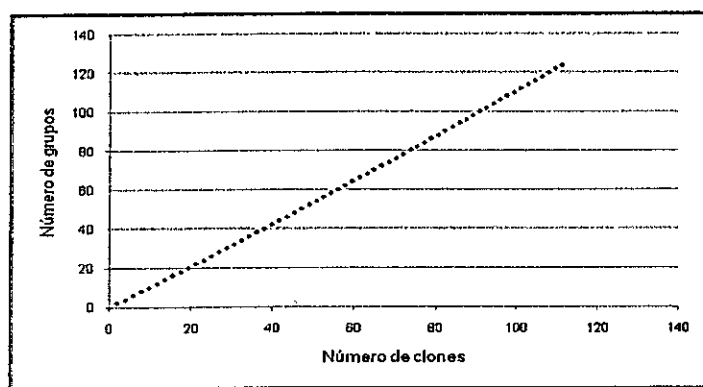


Figura 5. Curva de rarefacción para los clones obtenidos a partir de suelo semiárido.

### 3.2. Efecto de los tratamientos sobre la diversidad genética de la comunidad bacteriana del suelo en los ensayos de microcosmos

Los efectos de los tratamientos sobre la diversidad genética bacteriana se determinaron mediante perfiles de TRFLP. La amplificación del gen para el RNA ribosomal 16S, se realizó con el partidor *forward* (fD1) marcado en su extremo 5' con el fluoróforo FAM, y la digestión de los amplicones se realizó con las enzimas de corte frecuente *HaeIII* y *MspI*. Los fragmentos terminales (TRFs) obtenidos se graficaron en función de su tamaño y de su fluorescencia relativa, de esta manera el perfil de TRFLP entrega información sobre la riqueza y abundancia de los filotipos presentes en la comunidad. El efecto de los tratamientos sobre la diversidad genética se determinó mediante algoritmos de similitud y análisis de correspondencia canónica.

Para evaluar el efecto de las perturbaciones en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo, se diseñaron dos experimentos de microcosmos: i) efecto de la disponibilidad de agua y ii) efecto de la adición de Nr ácido

#### 3.2.1 Efecto de la disponibilidad de agua

El efecto de la disponibilidad de agua se evaluó en base al tratamiento del suelo con pulsos de agua cada 14 días versus un control que se mantuvo durante los 84 días de incubación sin riego. Los perfiles de TRFLP para ambos microcosmos, R-tH<sub>2</sub>O(14) y R-s/t, se muestran en la figura 6. Los gráficos dan cuenta de la riqueza de la comunidad, en base a los TRFs presentes y a la abundancia relativa de cada uno de estos filotipos (% UF). Una observación directa



sugiere que en ambos microcosmos los principales TRFs se mantienen durante la incubación de los microcosmos variando sólo la abundancia de algunos de éstos.

Un análisis de similitud de los perfiles de TRFLP, en base a una matriz binaria de presencia/ausencia (riqueza de TRFs) mediante un algoritmo de UPGMA y el índice de similitud de Jaccard (Figura 7), demuestra que las muestras tratadas se agrupan independiente de las muestras controles. Estas últimas, a excepción de la del tiempo 56, son más similares entre sí que las obtenidas del microcosmos tratado. De acuerdo a este análisis la perturbación aplicada afectaría la riqueza de filotipos de la comunidad estudiada.

Para corroborar la significancia del agrupamiento obtenido (Figura 7) se realizó un análisis de similitud utilizando el programa ANOSIM (Clarke, 1993). La tabla 3 muestra los resultados obtenidos para los R con sus respectivos  $p$ . Se observa un R alto, sobre 0,5 y un  $p$  significativo estadísticamente, lo cual corrobora que las diferencias entre el grupo tratado respecto del control son mayores que las diferencias intragrupos, al no considerar la muestra sin tratamiento del tiempo 56. Cuando esta muestra es considerada, el R disminuye debido a la gran diferencia existente entre esta muestra y el resto de las sin tratamiento.

Un análisis multivariado que incluye los componentes de la diversidad (riqueza y abundancia) y los parámetros edáficos medidos durante el ensayo de microcosmos (Anexo 1), muestra que los microcosmos tratados se separan de los controles, a lo largo del eje canónico 2 (Figura 8), lo cual afirma un efecto del tratamiento sobre la microbiota. El factor edáfico que explicaría esta separación es el contenido hídrico (Tabla 4). Una vez más se observa que la muestra R-s/t t56 se separa del grupo de las sin tratamiento a lo largo del eje canónico 1 esta diferencia puede explicarse por el pH (Tabla 3), el cual para este punto disminuye levemente.

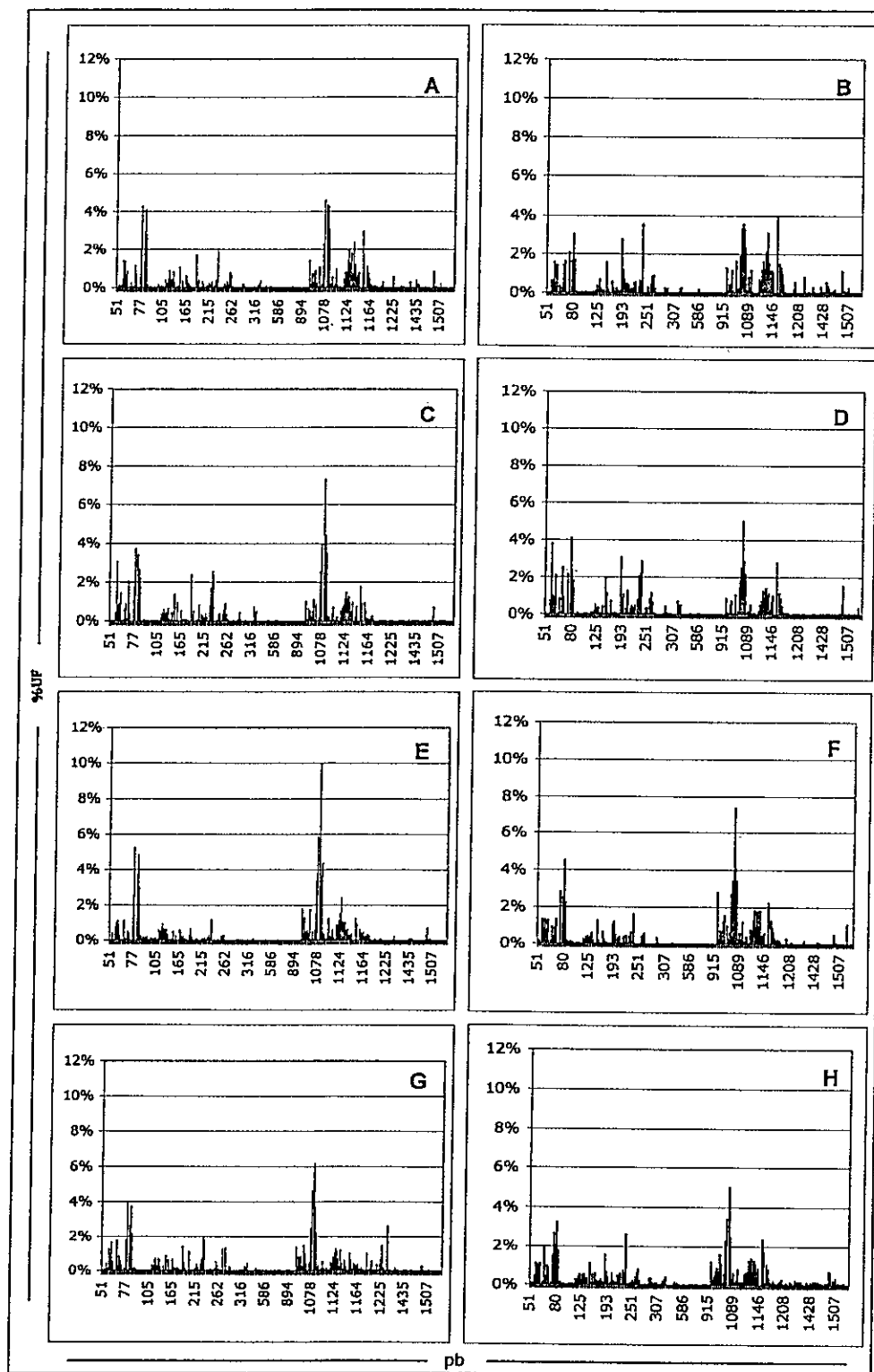
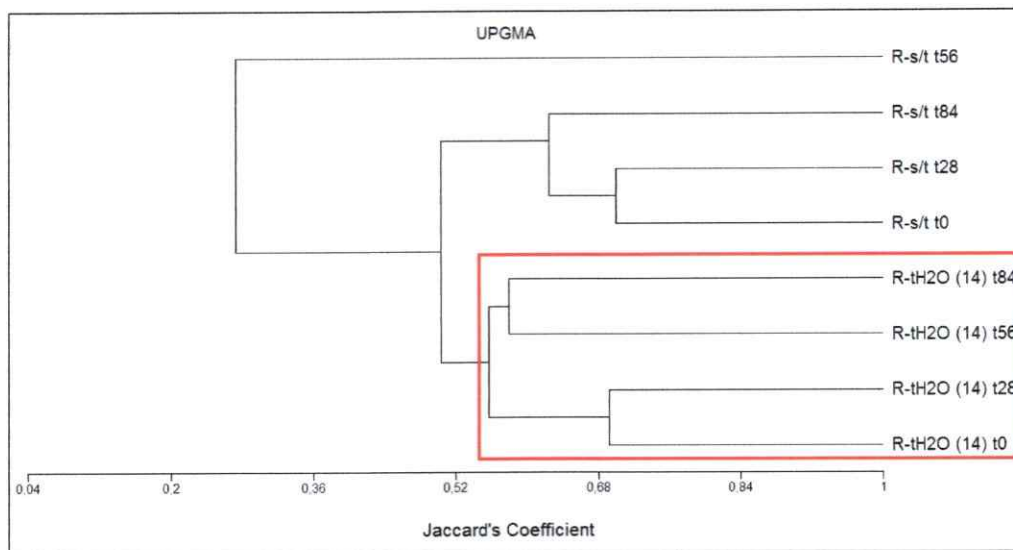


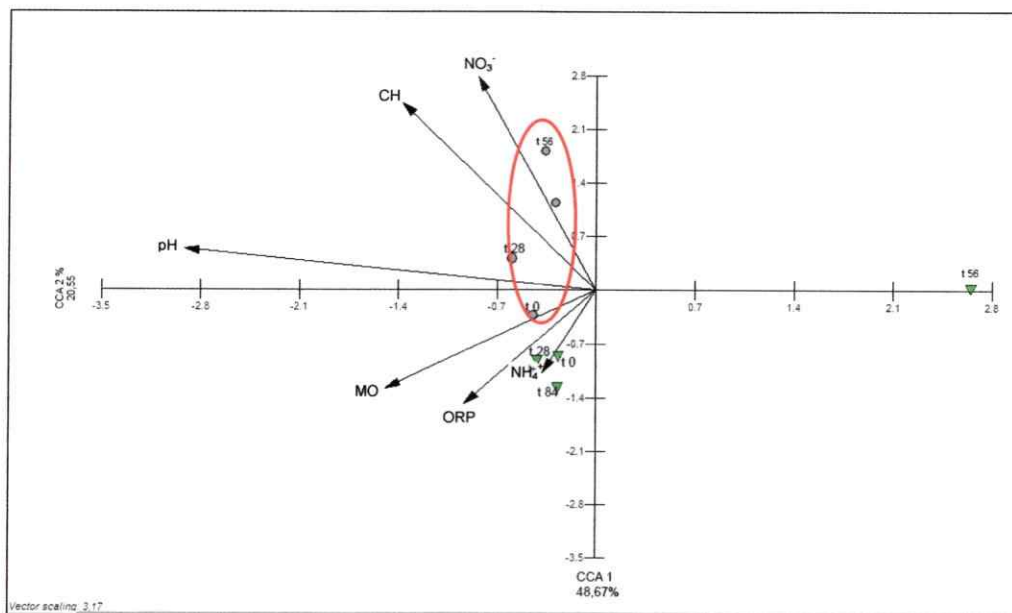
Figura 6. Perfiles de TRFLP de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua, a los tiempos 0, 28, 56 y 84 de incubación. R-tH<sub>2</sub>O(14): A, C, E, G; R-s/t: B, D, E, H.



**Figura 7.** Dendrograma obtenido a partir de los datos de TRFLP para los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.

**Tabla 3.** Análisis de similitud entre los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.

	R-s/t	R-s/t sin t56
R-tH <sub>2</sub> O(14)	R=0,432 p=0,022	R=0,713 p= 0,025



**Figura 8.** Análisis de correspondencia canónica obtenido a partir de los datos de TRFLP para los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua. Círculos grises: microcosmos R-H<sub>2</sub>O(14); triángulos verdes: microcosmos control A, R-s/t. Parámetros edáficos: pH; potencial de óxido reducción (ORP); contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); contenido de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Entre los ejes 1 y 2 se acumula el 69,22% de la varianza. El óvalo rojo agrupa a las muestras tratadas con agua.

**Tabla 4.** Coeficientes de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los TRFLP en los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.

Parámetros Edáficos <sup>a</sup>	Coeficiente canónico		<i>p</i>	F
	CCA1	CCA2		
<b>pH*</b>	<b>-0,917</b>	0,169	0,001	4,47
<b>ORP</b>	-0,293	-0,466	0,534	0,89
<b>CH*</b>	-0,433	<b>0,768</b>	0,008	1,78
<b>MO</b>	-0,469	-0,401	0,167	1,72
<b>NH4+</b>	-0,119	-0,339	0,384	1,16
<b>NO3-</b>	-0,265	0,877	0,273	1,38
<b>1º eje canónico</b>			0,304	0,948
<b>Suma ejes</b>			0,097	2,771

<sup>a</sup> pH; potencial de óxido reducción (ORP); contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); contenido de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

\* En rojo se muestran los parámetros que más influyen sobre la dispersión de los datos con significancia estadística.

Finalmente, la diversidad genética de la comunidad bacteriana se evaluó en términos de los parámetros ecológicos rango de riqueza de los TRFs, dinámica y organización funcional.

Para el rango de riqueza se pueden observar valores medios y bajos tanto en el microcosmos tratado con agua como en su control sin tratamiento (Tabla 5). A pesar de la alta desviación de los datos, pareciera existir un pequeño efecto del tratamiento sobre las muestras de disponibilidad de agua, sin embargo tanto el microcosmos tratado como el control se mantienen, prácticamente durante toda la incubación, con rangos de riqueza bajos.

Respecto a la dinámica, representada como la tasa de cambio entre los tiempos de incubación para cada microcosmos, se observa que el microcosmos tratado y el control presentan tasas de cambio altas entre los tiempos, lo que da cuenta de una comunidad dinámica que responde a las condiciones de incubación (Tabla 6), independientemente de la aplicación de agua.

Finalmente, la organización funcional (Figura 9) de la comunidad revela que el 20% de los filotipos acumulan el 60% de la fluorescencia relativa, lo cual indica que esta comunidad tiene una alta organización funcional. Esta tendencia se puede observar en el microcosmos tratado con agua cada 14 días y en el control sin tratamiento, indicando que la organización funcional de esta comunidad bacteriana es resistente a la perturbación aplicada.

Si se categorizan los resultados obtenidos para el rango de riqueza, la dinámica y la organización funcional en una escala de alto-medio-bajo según los resultados obtenidos, se puede observar en un gráfico 3D el comportamiento de la

comunidad ante estas variables ecológicas (Figura 10). Este gráfico muestra en resumen que tanto el microcosmos tratado con agua como el control presentan el mismo comportamiento en relación a los parámetros ecológicos, lo que indicaría que la perturbación simulada por los pulsos de agua cada 14 días no afectaría la diversidad de la comunidad. Sin embargo, dado que las comunidades estudiadas presentan un bajo rango de riqueza, pequeños cambios en el número de filotipos afectarían el índice de similitud de las muestras, lo que explicaría la segregación de ellas en el dendrograma (Figura 7).

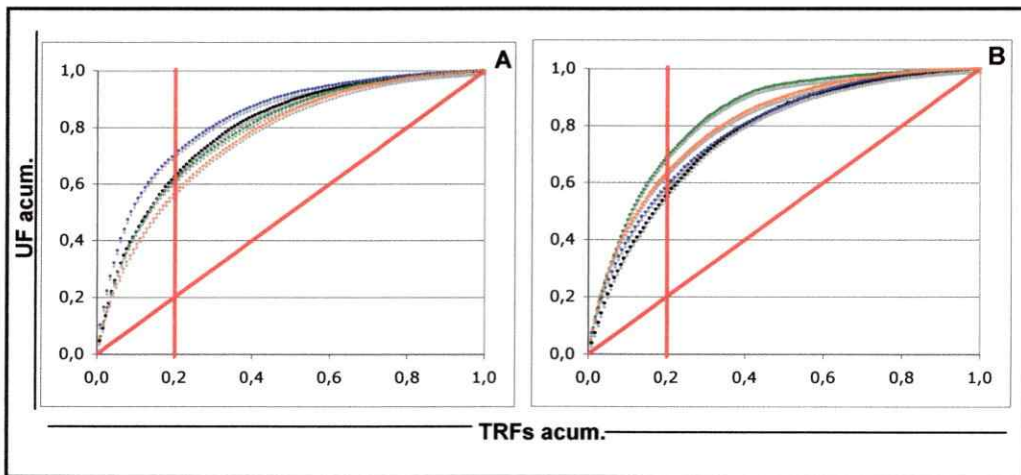
**Tabla 5.** Rango de riqueza (Rr) genética de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua basado en la abundancia de los TRFs.

	Rr
R-tH <sub>2</sub> O(14) t0	7,13 ± 1,88
R-tH <sub>2</sub> O(14)t28	9,10 ± 2,88
R-tH <sub>2</sub> O(14)t56	10,58 ± 3,92
R-tH <sub>2</sub> O(14)t84	6,91 ± 1,57
R-s/t t0	8,80 ± 2,42
R-s/t t28	9,82 ± 2,58
R-s/t t56	8,32 ± 3,30
R-s/t t84	9,03 ± 3,97

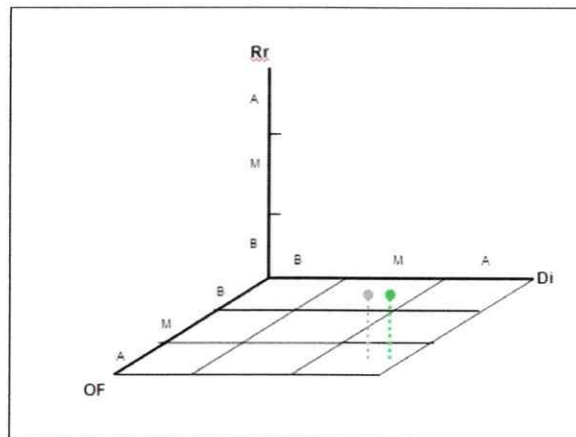
Rango medio ( $10 < Rr < 30$ ) y rango bajo ( $Rr < 10$ ).

**Tabla 6.** Dinámica (Di) de cambio genético para los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.

	Di (%)
R-H <sub>2</sub> O(14)	48,46 ± 8,56
R-s/t	52,22 ± 4,58



**Figura 9.** Organización funcional, a nivel genético, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua. (A) R-tH<sub>2</sub>O(14); (B) R-s/t. Negro, t0; verde, t28; morado, t56; naranja, t84. Se grafica el promedio de las tres réplicas.



**Figura 10.** Gráfico 3D de los parámetros ecológicos dinámica (Di), rango de riqueza (Rr) y organización funcional (OF), a nivel genético, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua. R-tH<sub>2</sub>O(14) (gris:); R-s/t (verde). Categorías ejes: A, alto; M, medio; B, bajo.

### 3.2.2. Efecto del nitrógeno reactivo ácido.

Para evaluar el efecto del Nr ácido, se separaron estos dos factores edáficos en un experimento de microcosmos de 2x2. Se construyeron cuatro microcosmos independientes con los siguientes tratamientos al inicio del experimento: un control tratado únicamente con agua desionizada (Control B, R-tH<sub>2</sub>O), un microcosmos tratado con una solución acuosa acidificada a pH 4 para ver el efecto del ácido (R-tAc), un microcosmos tratado con una solución de Nr (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) para evaluar el efecto de este nutriente (R-tNr) y finalmente un último microcosmos que combina los dos anteriores usando una solución ácida de Nr (R-tNrAc).

Tal como en el caso anterior, se graficaron los TRFLP en término de la riqueza de fragmentos (pb) y la abundancia relativa de éstos (% UF) (Figura 11). Se puede observar, que durante el tiempo de incubación, los TRFs principales varían sólo en abundancia, sin embargo parece no haber grandes diferencias entre el microcosmos control (R-tH<sub>2</sub>O) y los distintos tratamientos.

Los perfiles de TRFLP muestran que la riqueza de TRFs es similar entre los distintos tratamientos aplicados, en cambio se observan claras variaciones en la abundancia relativa de los TRFs. Para comparar los perfiles se realizó un análisis de similitud en base a una matriz binaria de presencia/ausencia mediante el algoritmo de UPGMA y el índice de similitud de Jaccard, usando el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK). El dendrograma (Figura 12) muestra que el tratamiento con ácido, no produce diferencias significativas respecto del control regado con agua, quedando ambos microcosmos agrupados. En cuanto al efecto



con Nr, la comunidad bacteriana parece responder tempranamente al tratamiento formándose un grupo separado desde el tiempo 0 de incubación, medido a las 3 horas de aplicar el tratamiento. Por otro lado, tal como en el caso del efecto del ácido, las muestras tratadas con Nr ácido (R-tNrAc) no muestran diferencias con las tratadas sólo con Nr, lo cual podría explicarse por la capacidad tampón del suelo, por lo cual la perturbación aplicada (pH 4,0) no fue suficiente para reducir significativamente el pH del microcosmos. Estos agrupamientos están sustentados estadísticamente por un análisis de similitud (Tabla 7). Cabe mencionar que este análisis de similitud se realiza en base a la presencia o ausencia de TRFs, por lo tanto está sustentado sólo por la riqueza que presentan cada uno de los ensayos.

Los datos obtenidos se sometieron además a un análisis de correspondencia canónica (Figura 13). Este análisis permite relacionar los perfiles de TRFLP con las variables edáficas (Anexo 1), por lo tanto entrega mayor información sobre el efecto de los tratamientos en la comunidad bacteriana. El comportamiento de las muestras es similar al obtenido en el dendrograma (Figura 12). Las diferencias entre las muestras tratadas con Nr (R-tNr y R-tNrAc) en comparación al control (R-tH<sub>2</sub>O) y al microcosmos tratado con ácido (R-tAc) están dadas principalmente a lo largo del eje canónico 1, los coeficientes de correlación indican que este eje está mayormente influenciado por el parámetro contenido de nitrato (Tabla 8).

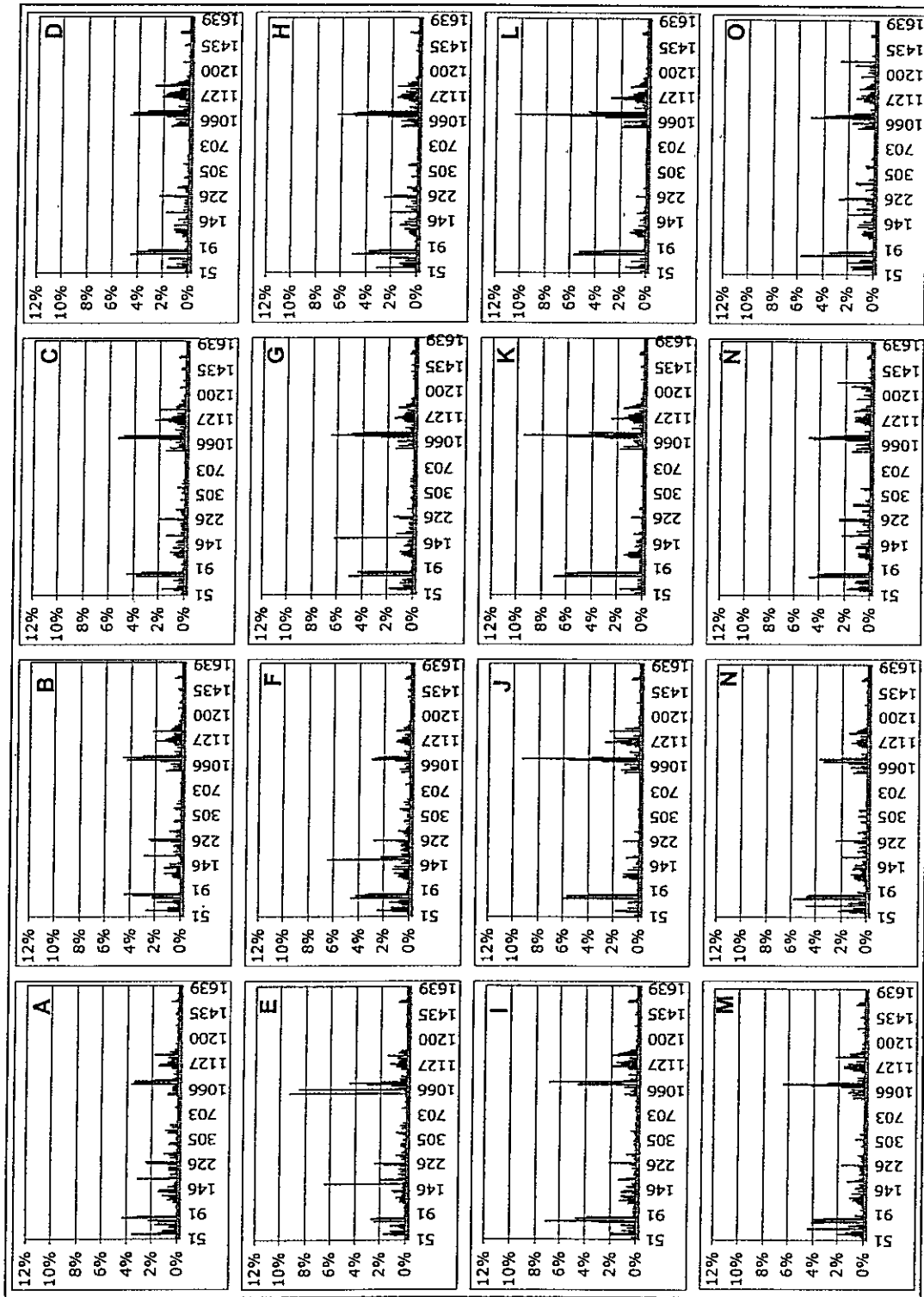
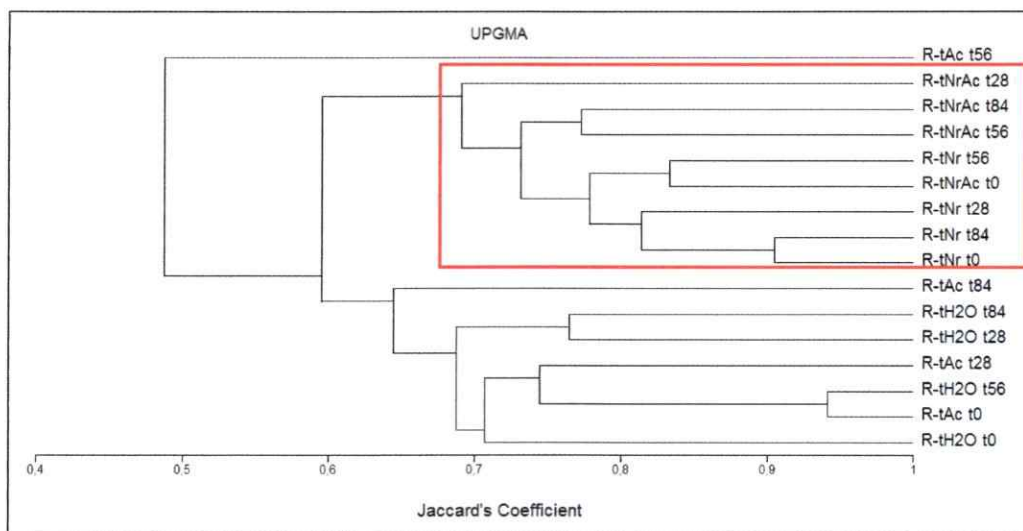


Figura 11. Perfiles de TRFLP de los microcosmos de efecto del nitrógeno reactivo ácido. Eje X: tamaño del fragmento en pb, eje Y: fluorescencia relativa en %JF. A-E-I-M. R-tH<sub>2</sub>O. R-tH<sub>2</sub>O. R-tAc; B-F-J-N. R-tAc; C-G-K-N. R-tN<sup>-</sup>; D-H-L-O. R-tN<sup>-</sup>; a los 0, 28, 56 y 84 días de incubación.

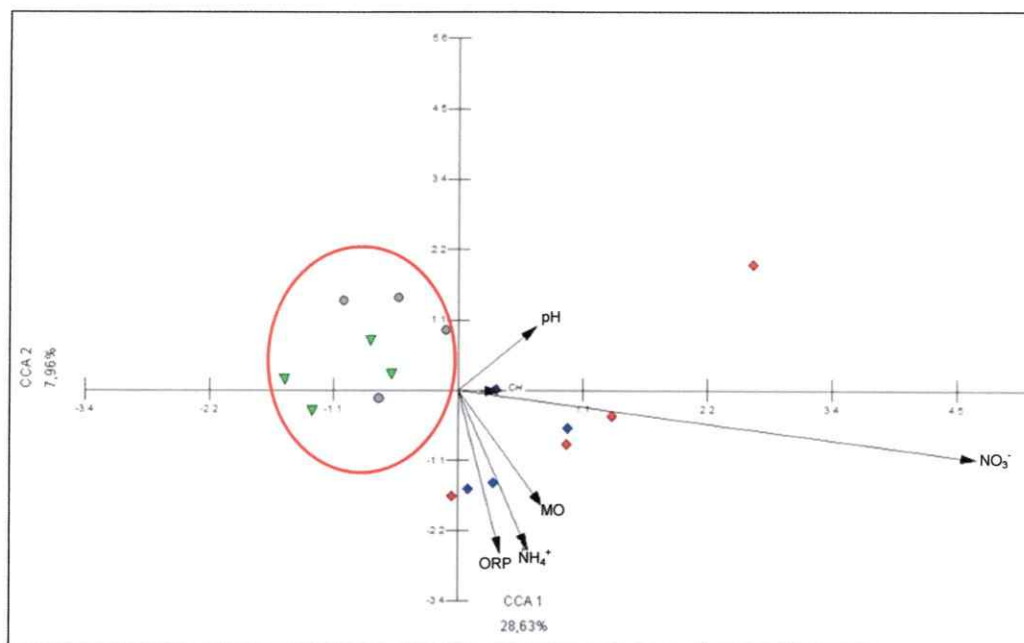


**Figura 12.** Dendrograma obtenido a partir de los datos de TRFLP para los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido. El recuadro rojo indica el agrupamiento de las muestras tratadas con Nr.

**Tabla 7.** Análisis de similitud entre los microcosmos montados para determinar el efecto de Nr ácido.

	R-tH2O	R-tAc	R-tNr
R-tAc	R= 0,083 <i>p</i> = 0,276		
R-tNr	R= 0,692 <i>p</i> = 0,034	R= 0,62 <i>p</i> = 0,03	
R-tNrAc	R= 0,95 <i>p</i> = 0,042	R= 0,776 <i>p</i> = 0,026	R= 0,425 <i>p</i> = 0,054

En gris se señalan los grupos cuyo R representa diferencias, las que son estadísticamente sustentadas por *p*.



**Figura 13.** Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP y los factores edáficos durante el tiempo de incubación de microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido. Círculos grises: microcosmos control R-tH<sub>2</sub>O, triángulos verdes: microcosmos R-tAc; cuadrados azules: microcosmos R-tNr; rombos rojos: microcosmos R-tNrAc. Parámetros edáficos: pH; potencial de óxido reducción (ORP); contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); contenido de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Entre el eje 1 y 2 se acumula el 36,59% de la varianza. El óvalo rojo agrupa la mayoría de las muestras de R-tAc y R-tH<sub>2</sub>O.

**Tabla 8.** Coeficientes de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los TRFLP en los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido

Parámetros Edáficos <sup>a</sup>	Coeficiente canónico		<i>p</i>	F
	CCA1	CCA2		
pH	0,113	0,163	0,657	0,78
ORP	0,061	-0,419	0,488	0,98
CH	0,063	-0,004	0,006	2,40
MO	0,124	-0,301	0,495	1,00
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,102	-0,411	0,231	1,29
NO <sub>3</sub> <sup>-*</sup>	0,752*	-0,178	0,001	3,06
1° eje canónico*			0,001	3,61
Suma ejes*			0,014	1,63

<sup>a</sup> pH; potencial de óxido reducción (ORP); contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); contenido de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

\* En rojo se muestran los parámetros que más influyen sobre la dispersión de los datos.

\* Datos estadísticamente significativos (*p* < 0,05)

Tal como en el caso de la disponibilidad de agua (punto 3.1.3.1), se evaluaron los parámetros ecológicos rango de riqueza, dinámica y organización funcional de la comunidad para ver si las comunidades respondían a las perturbaciones aplicadas. La Tabla 9 muestra el rango de riqueza obtenido para cada microcosmos en cada tiempo de incubación. Los valores para la mayoría de los microcosmos están en el rango medio y alto. El menor rango de riqueza se observa en el microcosmos tratado con ácido, cuyo rango es menor que el que muestra el control, lo cual podría reflejar la respuesta de la comunidad ante esta perturbación. En el caso del microcosmos tratado con Nr se observan diversidades medias y altas, que no se diferencian significativamente del control. Finalmente, el microcosmos del efecto de Nr ácido presenta un menor rango de riqueza que el tratado sólo con Nr y también que el microcosmos control, lo cual concuerda con lo observado en el microcosmos del efecto tratado con ácido versus el control con agua.

En cuanto a la dinámica poblacional entre los tiempos de incubación, una vez más nos encontramos con una comunidad capaz de responder a las perturbaciones a través de una alta tasa de cambio para todos los microcosmos tratados como así también para la situación control (Tabla 10).

Finalmente en cuanto a la organización funcional, parámetro que permite conocer la estructura de la comunidad para preveer la reacción de ésta ante una perturbación, observamos una organización funcional alta, en todos los microcosmos y para todos los tiempos de incubación, la cual no varía demasiado en el tiempo ni tampoco entre los microcosmos tratados respecto del control (Figura 14).

Tomando el rango de riqueza (Rr), la dinámica (Di) y la organización funcional (OF) en las categorías definidas en el punto anterior (alto-medio-bajo), se graficó en tres dimensiones el comportamiento de la comunidad ante las perturbación de Nr ácido (Figura 15). Se puede observar que el microcosmos tratado únicamente con Nr no difiere en comportamiento respecto del control, mientras que los tratados con solución ácida presentan un menor rango de riqueza que el control tratado con agua, lo cual podría asociarse al efecto del tratamiento ácido sobre la comunidad bacteriana del suelo.

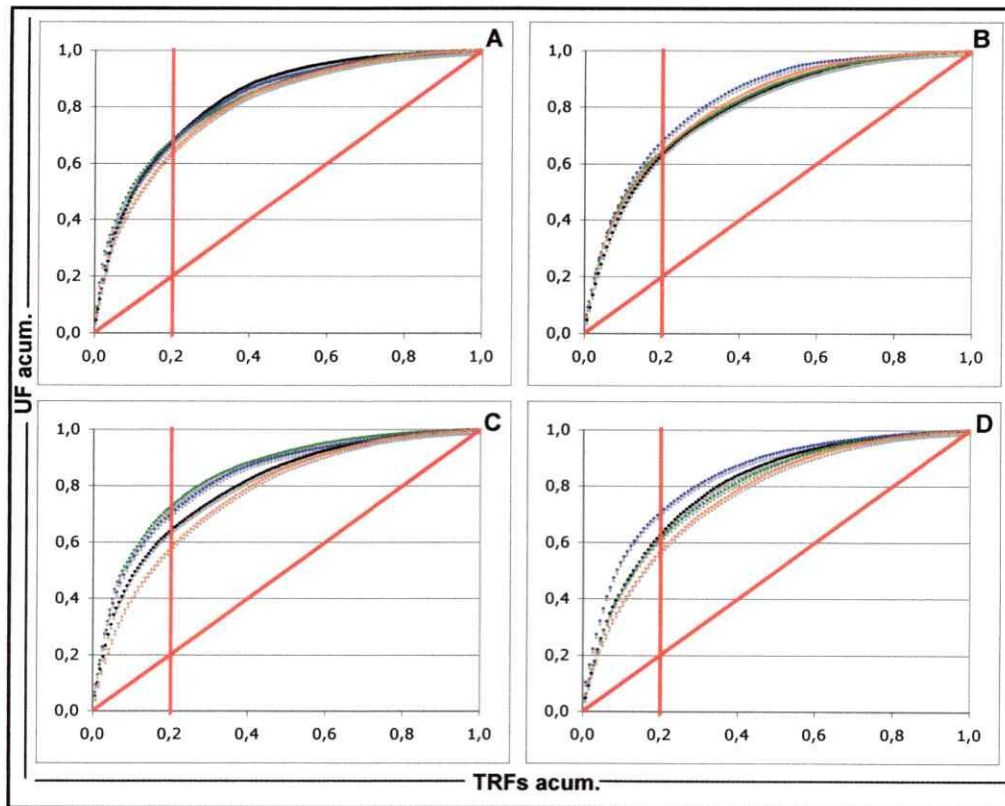
**Tabla 9.** Rango de riqueza (Rr) basado en la abundancia de los TRFs de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.

	Rr
R-tH <sub>2</sub> O t0	32,14 ± 0,17
R-tH <sub>2</sub> O t28	33,04 ± 7,44
R-tH <sub>2</sub> O t56	26,02 ± 6,36
R-tH <sub>2</sub> O t84	28,61 ± 6,66
R-tAc t0	19,86 ± 4,13
R-tAc t28	12,46 ± 3,61
R-tAc t56	24,71 ± 0,17
R-tAc t84	14,73 ± 3,79
R-tNr t0	21,64 ± 5,49
R-tNr t28	43,00 ± 9,68
R-tNr t56	18,78 ± 1,84
R-tNr t84	41,50 ± 5,60
R-tNrAc t0	24,05 ± 0,75
R-tNrAc t28	17,00 ± 7,00
R-tNrAc t56	18,87 ± 11,51
R-tNrAc t84	12,99 ± 3,72

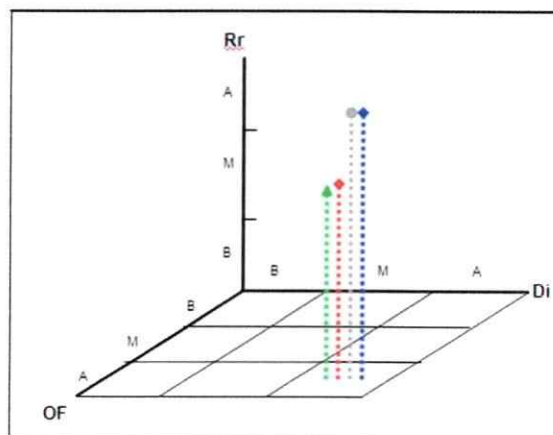
Rr alto (Rr>30), medio (10<Rr<30).

**Tabla 10.** Dinámica (Di) de cambio genético para los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.

	Di (%)
R-tH <sub>2</sub> O	43,06 ± 9,35
R-tAc	51,70 ± 11,46
R-tNr	44,94 ± 0,93
R-tNrAc	38,35 ± 17,22



**Figura 14.** Organización funcional, a nivel genético, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido. A. Control B, R-tH<sub>2</sub>O; B. R-tAc; C. R-tNr; D. R-tNrAc. En negro t<sub>0</sub>, verde t<sub>28</sub>; morado t<sub>56</sub>; naranja t<sub>84</sub>. Se grafica el promedio de las tres réplicas.



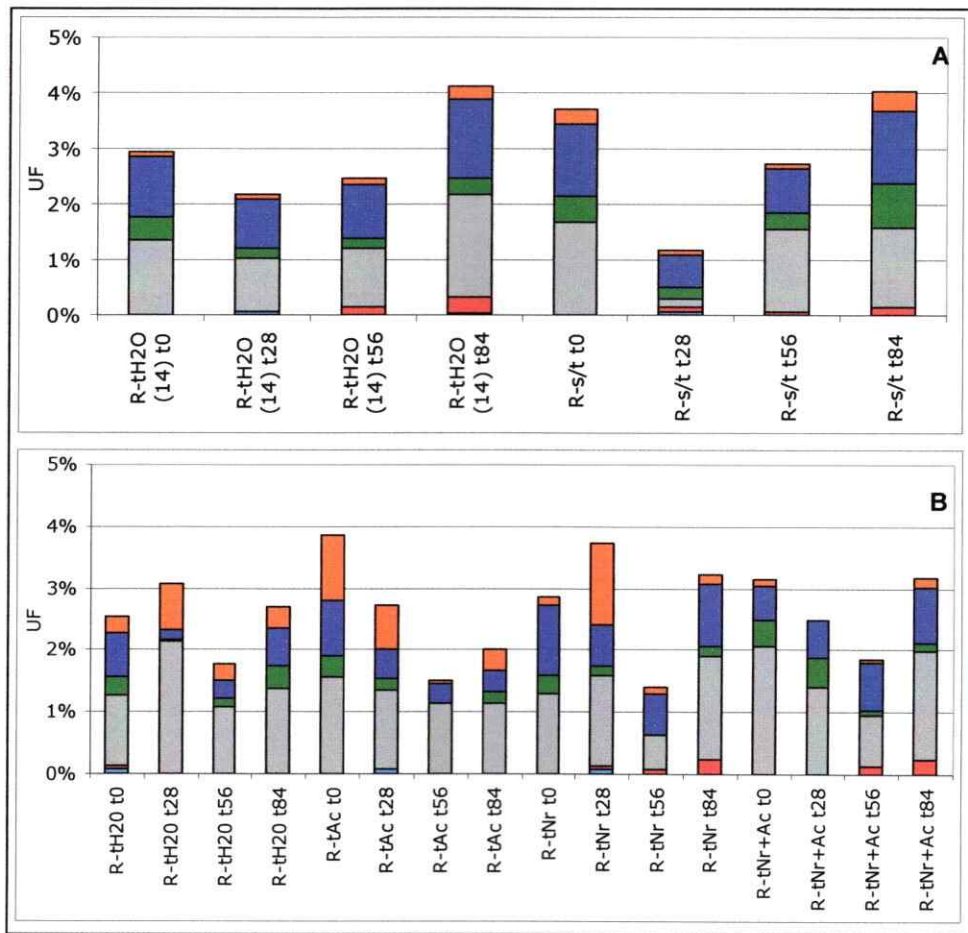
**Figura 15.** Gráfico 3D de los parámetros ecológicos dinámica (Di), rango de riqueza (Rr) y organización funcional (OF), a nivel genético, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido. R-tAc (verde), R-tNr (azul), R-tNrAc (rojo) y el control B, R-tH<sub>2</sub>O (gris). Categorías ejes: A, alto; M, medio; B, bajo.

### 3.3. Relación entre los perfiles de TRFLP y la composición inicial de la comunidad

En base a las secuencias obtenidas desde la base de datos, utilizadas para construir el árbol filogenético con las secuencias de los clones obtenidos (Figura 4), se realizó un análisis de digestión *in silico*, con el propósito de clasificar los TRFs obtenidos dentro de los principales grupos bacterianos. Se logró identificar entre un 1,5% y un 4,5% de los TRFs en los grupos estudiados, por lo que sobre un 90% de los fragmentos terminales obtenidos no pudo ser clasificado dentro de los grupos evaluados. Esto último puede deberse a dos motivos, el primero es la baja cobertura de la librería de clones (10,4% de la diversidad total), y la segunda es que algunas de estas secuencias produjeron cortes terminales bajo el límite de detección de la técnica de TRFLP.

La Figura 16 muestra las variaciones de la fracción identificada en los distintos microcosmos. Se observa una dominancia de bacteroidetes en ambos experimentos, la cual se mantiene durante toda la incubación independientemente del tratamiento aplicado. Otros grupos que alcanzan cierta relevancia son las proteobacterias y verrucomicrobia. Las acidobacterias y actinobacterias están presentes en menor proporción y aparecen esporádicamente durante la incubación en algunos tratamientos. Los gemmatimonadetes no fueron detectados en el análisis de los TRFs probablemente porque están en baja abundancia y por lo tanto bajo el límite de detección.





**Figura 16.** Frecuencia relativa de los principales grupos bacterianos durante la incubación de los microcosmos. A. Microcosmos R-tH<sub>2</sub>O(14) y control A, R-s/t. B. R-tAc, R-tNr, R-tNrAc y el control B, R-tH<sub>2</sub>O. En naranja: verrucomicrobia; morado: proteobacterias; verde: firmicutes; gris: bacteroidetes; rojo: actinobacterias; celeste: acidobacterias.

### 3.4. Efecto de los tratamientos en la diversidad metabólica de la comunidad microbiana del suelo en los ensayos de microcosmos

La diversidad metabólica de una muestra fue evaluada a través de la medición de la utilización de 31 fuentes de carbono utilizando BIOLOG EcoPlate™. Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la diversidad metabólica de la comunidad, se determinaron los parámetros ecológicos: rango de riqueza, dinámica y organización funcional basados en la utilización de las fuentes de carbono, las cuales fueron separadas en categorías: carbohidratos, aminoácidos, aminas/amidas, ácidos carboxílicos, polímeros y misceláneas en base a las categorías propuestas por Preston-Mafham y col. (2002).

#### 3.4.1. Efecto de la disponibilidad de agua

En la Tabla 11 se muestra la proporción de fuentes de carbono utilizadas en relación al total de muestras disponibles en cada categoría. Se observa que el microcosmos sometido a pulsos de agua consume, al final de la incubación, una mayor proporción de estas fuentes de carbono que el microcosmos sin tratar. Además, se observa que las mayores variaciones entre los tiempos de incubación están en el consumo de ácidos carboxílicos y polímeros, y que estas fuentes de carbono son también las que más varían entre el microcosmos tratado y el control. Los aminoácidos corresponden al único grupo que es consumido en un 100%. Las aminas y amidas no presentan variaciones entre microcosmos ni entre tiempos de incubación, llegando a un máximo de consumo de un 50% del grupo.

Tomando las 31 fuentes de carbono totales en relación a las consumidas por cada comunidad, se evaluó el rango de riqueza metabólica de la comunidad

microbiana de cada microcosmos. En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos para el rango de riqueza, que en todos los casos es de nivel medio.

La dinámica de la comunidad se calculó en base al porcentaje de cambio de consumo de cada fuente de carbono entre 2 tiempos contiguos, es decir entre el tiempo 0-42 y 42-84 (Tabla 13). Se puede observar que a pesar de que se registran cambios en la utilización de las fuentes, las variaciones son bajas, siendo un poco mayor la dinámica en el microcosmos que no fue tratado.

Tabla 11. Utilización de fuentes de carbono por categorías, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.

	RtH <sub>2</sub> O(14) t0	RtH <sub>2</sub> O(14) t42	RtH <sub>2</sub> O(14) t84
Aminas/amidas	1/2	1/2	1/2
Aminoácidos	6/6	6/6	6/6
Carbohidratos	6/7	6/7	6/7
Ác. Carboxílicos	8/9	9/9	8/9
Misceláneos	2/3	2/3	2/3
Polímeros	3/4	3/4	2/4
	R s/t t0	R s/t t42	R s/t t84
Aminas/amidas	1/2	1/2	1/2
Aminoácidos	6/6	6/6	6/6
Carbohidratos	7/7	6/7	6/7
Ác. Carboxílicos	9/9	8/9	6/9
Misceláneos	2/3	2/3	2/3
Polímeros	3/4	2/4	1/4

Tabla 12. Rango de riqueza (Rr) metabólico del microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.

	Rr
R-tH <sub>2</sub> O (14) t0	17,66 ± 3,07
R-tH <sub>2</sub> O (14) t42	18,63 ± 7,54
R-tH <sub>2</sub> O (14) t84	13,25 ± 5,17
R-s/t t0	23,16 ± 5,36
R-s/t t42	15,76 ± 3,65
R-s/t t84	10,65 ± 3,49

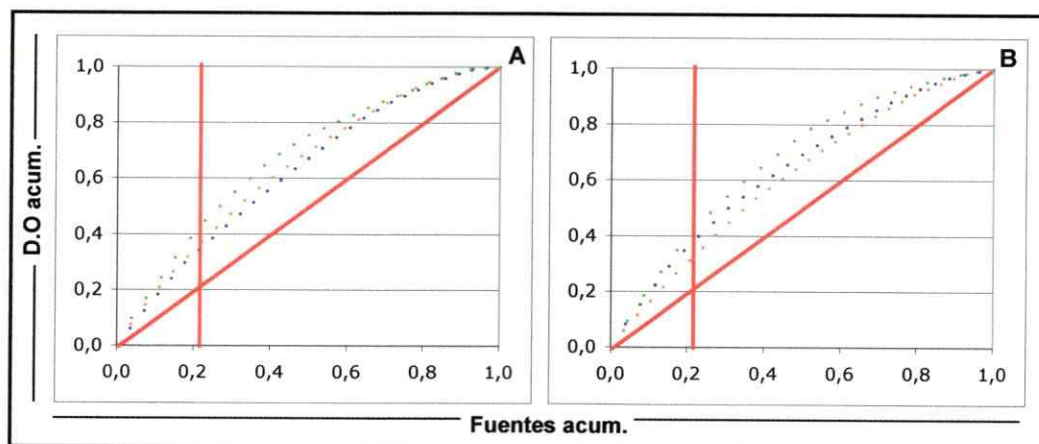
Rr alto (Rr>30), medio (10<Rr<30) y bajo (Rr<10).

Tabla 13. Dinámica (Di) metabólica de la comunidad en los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua.

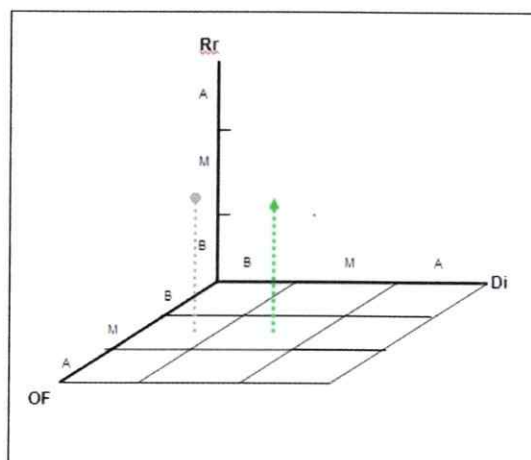
	Di (%)
R-tH <sub>2</sub> O (14)	8,74 ± 2,26
R-s/t	10,94 ± 0,84

En cuanto a la organización funcional de la comunidad en términos metabólicos se puede ver que ésta es media (Figura 17), cercana al 45% (Figura 1). Esta organización es independiente del tratamiento aplicado y del tiempo de incubación ya que se observa un comportamiento similar en el microcosmos montado para determinar el efecto de la disponibilidad de agua y en el control sin tratamiento durante los tiempos 0, 42 y 84 días de incubación.

Tomando entonces rango de riqueza, dinámica y organización funcional en un gráfico 3D (Figura 18) se observa que en términos de la dinámica el microcosmos tratado se diferencia del control, ya que este último presenta una tasa de cambio de nivel medio en comparación a la dinámica baja del microcosmos tratado. Respecto a los parámetros de rango de riqueza y organización funcional, ambos microcosmos presentan comportamiento similar.



**Figura 17.** Organización funcional, a nivel metabólico, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua. (A) R-tH<sub>2</sub>O(14); (B) control R-s/t. En naranja t0, morado t28; verde t84.



**Figura 18.** Gráfico 3D de los parámetros ecológicos dinámica (Di), rango de riqueza (Rr) y organización funcional (OF), a nivel metabólico, de los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua. R-tH<sub>2</sub>O(14) (gris:); control R-s/t (verde). Categorías ejes: A, alto; M, medio; B, bajo.

#### 3.4.2. Efecto del nitrógeno reactivo ácido.

Tal como se describe en el punto 3.2.1, se evaluó el nivel de utilización de fuentes de carbono consumidas por la comunidad de los microcosmos sometidos a perturbaciones de  $\text{Nr}$  ácido. La Tabla 14 muestra el consumo según las categorías propuestas por Preston-Mafham y col. (2002). A nivel metabólico no se observan grandes diferencias entre los microcosmos tratados respecto de su control, tampoco en los tiempos de incubación. Una vez más, los aminoácidos son el único grupo consumido en un 100% y se repite también el consumo de amidas de un 50% en todos los microcosmos y todos los tiempos.

Respecto al rango de riqueza en términos metabólicos, dado por el porcentaje de fuentes consumidas respecto del total, se observa en todos los microcosmos y en todos los tiempos de incubación un rango medio de riqueza (Tabla 15). No hay diferencias apreciables entre los tratamientos y su control.

Tabla 14. Utilización de fuentes de carbono por categorías, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.

Sustrato	R-H <sub>2</sub> O t0	R-H <sub>2</sub> O t42	R-H <sub>2</sub> O t84
Aminas/amidas	1/2	½	1/2
Aminoácidos	6/6	6/6	6/6
Carbohidratos	5/7	5/7	5/7
Ác. Carboxílicos	8/9	7/9	9/9
Misceláneos	1/3	2/3	2/3
Polímeros	2/4	¾	2/4
	R-Ac t0	R-Ac t42	R-Ac t84
Aminas/amidas	1/2	½	1/2
Aminoácidos	6/6	6/6	6/6
Carbohidratos	6/7	6/7	6/7
Ác. Carboxílicos	8/9	7/9	9/9
Misceláneos	2/3	2/3	1/3
Polímeros	3/4	2/4	2/4
	R-Nr t0	R-Nr t42	R-Nr t84
Aminas/amidas	1/2	½	1/2
Aminoácidos	6/6	6/6	6/6
Carbohidratos	6/7	7/7	6/7
Ác. Carboxílicos	9/9	8/9	5/9
Misceláneos	3/3	1/3	2/3
Polímeros	3/4	2/4	2/4
	R-AcNr t0	R-AcNr t42	R-AcNr t84
Aminas/amidas	1/2	½	1/2
Aminoácidos	6/6	6/6	6/6
Carbohidratos	6/7	6/7	4/7
Ác. Carboxílicos	8/9	8/9	8/9
Misceláneos	3/3	2/3	3/3
Polímeros	2/4	2/4	2/4

Tabla 15. Rango de riqueza (Rr) metabólico de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.

	Rr
R-tH <sub>2</sub> O t0	12,92 ± 1,29
RtH <sub>2</sub> O t42	11,38 ± 2,99
R-tH <sub>2</sub> O t84	11,33 ± 2,57
R-tAc t0	14,77 ± 2,81
R-tAc t42	12,51 ± 1,49
R-tAc t84	12,15 ± 2,54
R-tNr t0	18,12 ± 2,31
R-tNr t42	12,15 ± 2,54
R-tNr t84	9,05 ± 2,30
R-tNrAc t0	12,92 ± 1,29
R-tNrAc t42	11,61 ± 4,78
R-tNrAc t84	9,47 ± 3,01

Rr alto (Rr>30), medio (10<Rr<30) y bajo (Rr<10).



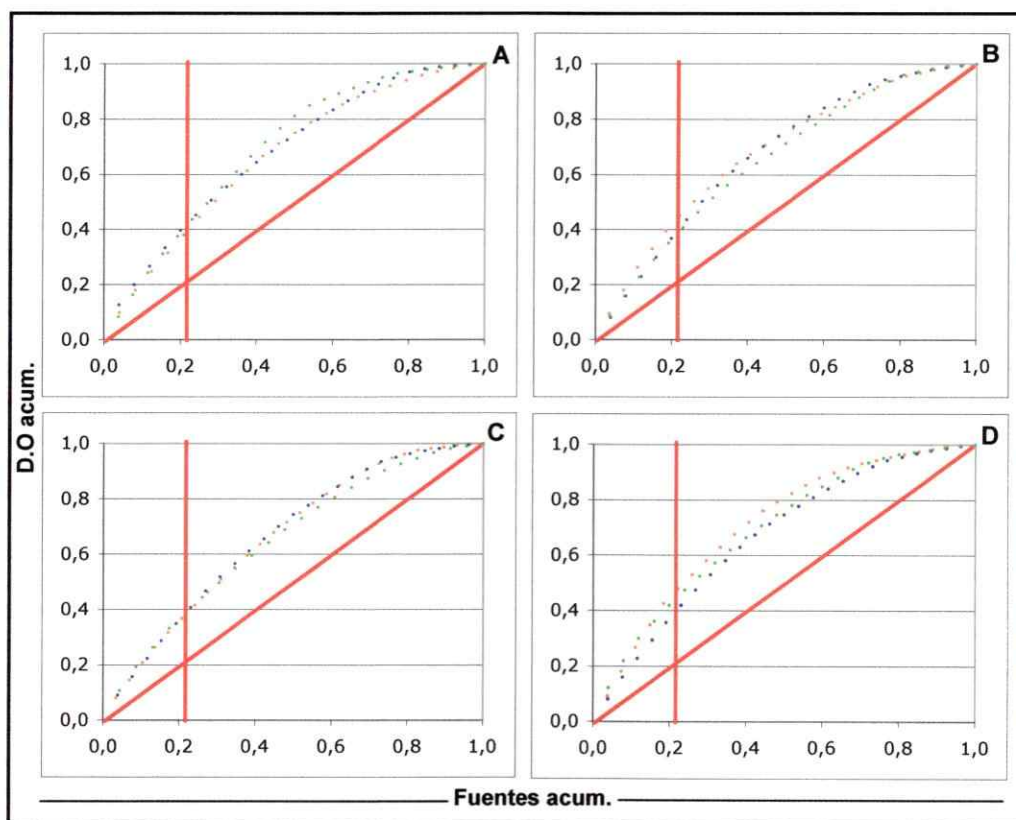
En cuanto a la dinámica metabólica de la comunidad estudiada (Tabla 16), ésta es media en los microcosmos tratados con Nr y en el control, sin embargo disminuye en el tratamiento para determinar el efecto del ácido quedando en categoría baja.

Por último, la organización funcional metabólica de la comunidad se grafica en la Figura 19. Tal como lo observado para los microcosmos montados para determinar el efecto de la disponibilidad de agua, la organización funcional en términos metabólicos es media, cercana a la curva teórica de 45%, la cual supone que existe una dominancia de ciertos rasgos metabólicos, y los organismos que presentan esta capacidad son mayoría.

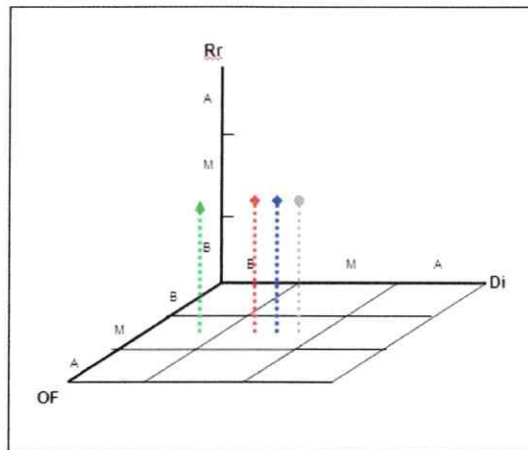
Resumiendo entonces los parámetros metabólicos rango de riqueza, dinámica y organización funcional, podemos observar que los microcosmos tratados con Nr, en condiciones neutras y ácidas, presentan un comportamiento similar al control, mientras que el microcosmos sometido a tratamiento ácido disminuye su dinámica en comparación a la situación control (Figura 20).

**Tabla 16.** Dinámica (Di) metabólica de la comunidad en los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido.

	Di (%)
R-H <sub>2</sub> O	19,76 ± 6,19
R-Ac	9,26 ± 2,62
R-Nr	20,83 ± 5,89
R-Ac+Nr	15,83 ± 2,87



**Figura 19.** Organización funcional, a nivel metabólico, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido. A. Control B, R-tH<sub>2</sub>O; B. R-tAc; C. R-tNr; D. R-tNrAc. En negro t0, verde t28; morado t56; naranja t84.



**Figura 20.** Gráfico 3D de los parámetros ecológicos dinámica (Di), rango de riqueza (Rr) y organización funcional (OF), a nivel metabólico, de los microcosmos montados para determinar el efecto del nitrógeno reactivo ácido. R-tAc (verde); R-tNr (azul); R-tNrAc (rojo) y R-tH<sub>2</sub>O (gris). Categorías ejes: A, alto; M, medio; B, bajo.

#### 4. DISCUSIÓN

Las recientes tasas de extinción de plantas y animales han llevado a los ecólogos a considerar las consecuencias de la pérdida de diversidad. En la actualidad, la mayoría de los estudios sobre biodiversidad y conservación se centran en macroorganismos, sin embargo dada la amplia abundancia de microorganismos y su función en servicios ecosistémicos básicos como la fertilidad de los suelos, es esencial incorporar a los microorganismos en los modelos de cambio global. Esto toma sentido al considerar que hoy los bienes y servicios ecosistémicos son valorados económicamente, ya que de ellos dependen las sociedades humanas (Ehrlich y Ehrlich, 1992; Allison y Martiny, 2008). Entonces, dado que los microorganismos juegan roles esenciales en la geología, hidrología y ecología, el conocimiento sobre la estructura y composición de las comunidades es importante para mejorar nuestro entendimiento conceptual y predictivo de los procesos ecosistémicos (Zhou y col., 2004).

El objetivo central de esta tesis fue determinar la influencia de ciertos parámetros conductores de cambio global, como son la acidificación, los pulsos de agua y el ingreso de nitrógeno reactivo en un sistema cerrado, sobre la comunidad bacteriana de un suelo semiárido. Para esto se abordaron los resultados en términos de la composición inicial de la comunidad bacteriana total del suelo, y la diversidad genética y metabólica en función de los tratamientos aplicados en ensayos de microcosmos.

#### **4.1. Composición de la comunidad bacteriana del suelo semiárido proveniente del matorral esclerófilo**

Los datos obtenidos muestran que de un total de 125 clones secuenciados, con perfiles de restricción únicos, más del 90% se relaciona principalmente con secuencias de otros clones ambientales no cultivados, lo cual es esperable ya que las bases de datos poseen un número limitado de bacterias cultivadas y descritas, debido a las dificultades en el aislamiento y cultivo (Kowalchuk y Stephen, 2001; Coleman y col., 2005). No obstante, las estimaciones de la diversidad microbiana en suelo son mucho mayores que en cualquier otro sistema, aparentemente porque la matriz de suelo es capaz de sustentar grandes poblaciones microbianas y promover su diversificación debido a la multiplicidad de microhábitats (Zhou y col., 2004). Es por esto que la genómica ambiental toma relevancia al permitir, por un lado, tener acceso a microorganismos específicos que son recalcitrantes al aislamiento y el cultivo en condiciones de laboratorio, y por otro, estudiar comparativamente distintos ensamblajes microbianos (Quaiser y col., 2003).

El agrupamiento filogenético de los clones muestran que ellos se distribuyen en 7 grupos filogenéticos: proteobacterias, acidobacterias, actinobacterias, firmicutes, gemmatimonadetes, verrucomicrobia y bacteroidetes (Figura 4). De estos, los grupos más representados en los clones obtenidos a partir de este suelo semiárido son proteobacterias (25,6%) y acidobacterias (14,4%), seguidos de firmicutes, actinobacterias y bacteroidetes. Los menos representados son verrucomicrobia y gemmatimonadetes. Los resultados obtenidos son comparables a lo descrito por otros

autores para suelos áridos de Arizona (Dunbar y col., 2002), suelos de bosques (Hackl y col., 2004) y praderas (Marilley y Aragno, 1999).

También se observan clones que no se relacionan con los linajes bacterianos mencionados anteriormente. Un estudio de Janssen (2006) sobre el American Type Culture Collection (ATCC) señala que la mayoría de las secuencias del gen del rRNA 16S, entre un 79% y un 89%, no están afiliadas a géneros conocidos. Coincidente con lo anterior, librerías de clones construidas a partir de suelo revelan que existen linajes no relacionados con aislados conocidos (Altschul y col., 1990; McCaig y col., 1999; Everett y col., 1999; Zhou y col., 2009).

Los grupos más representados entre los clones fueron proteobacterias y acidobacterias. La misma revisión de Janssen (2006), en base a 21 genotecas, equivalentes a un total de 2920 clones con secuencias distintas, señala que estos dos grupos son los más abundantes en suelo. Por otro lado, Zhou y col. (2004) también mostraron una dominancia de proteobacterias en comunidades de la subsuperficie del suelo, y Nagy y col. (2005) coincide en una mayor abundancia de las proteobacterias y acidobacterias, entre otras, en formaciones de costras biológicas de suelos áridos. Respecto de las acidobacterias, Quaiser y col. (2003) señalan que dada la diversidad filogenética, ubicuidad y abundancia de este grupo, particularmente en hábitats de suelo, tendrían un importante rol ecológico y una gran versatilidad metabólica. A diferencia de las proteobacterias, las acidobacterias, a pesar de ser un grupo de amplia distribución, sólo cuentan con 3 organismos cultivados, *Acidobacterium capsulatum*, *Geothrix fermentaris* y *Holophaga foetida*, del resto sólo se conoce la secuencia del gen para su rRNA 16S.

Entre los grupos menos representados están las verrucomicrobia. Se ha descrito que la abundancia de este grupo está controlada por los niveles de humedad del suelo (Janssen, 2006), los cuales en este suelo semiárido alcanzan valores entre 6 y 7% (Anexo 1), lo cual podría entonces explicar la baja representatividad del grupo en el sitio de estudio.

Es relevante destacar que falta bastante trabajo aún para tener una genoteca representativa de la comunidad bacteriana del suelo. En esta tesis obtuvimos 125 clones, y estimamos que una muestra representativa debiera constar de 1377 clones. Esto deja abierta proyecciones futuras de trabajo en este tipo de suelo, para aumentar la información disponible.

#### **4.2. Relación entre la composición inicial de la comunidad y las variaciones de la diversidad genética durante la incubación de los microcosmos**

Para determinar la relación entre la composición de la comunidad del suelo semiárido del matorral esclerófilo y las variaciones de la diversidad en los microcosmos, se hizo un análisis *in silico* de los clones y las secuencias relacionadas buscando los sitios de restricción terminal para las enzimas *HaeIII* y *MspI*, con el fin de contrastar esta información teórica con lo obtenido en los perfiles de TRFLP de la comunidad bacteriana. Con las secuencias de organismos cultivados sólo se logró identificar entre 1,5% y 4% de los fragmentos terminales que coincidían con los TRFLP (Figura 16). Esto, sumado a la cobertura de la genoteca (10,4%), nos señala que falta un mayor esfuerzo de muestreo para representar la diversidad de la comunidad que se

está estudiando, más aún si se reconoce que las comunidades de suelo sostienen altas diversidades.

En este análisis puede observarse la dominancia, dentro del bajo porcentaje identificado, de TRFs asociados a bacteroidetes, seguido de proteobacterias (Figura 16). Este último grupo es uno de los más abundantes según varios autores (Zhou y col., 2004; Nagy y col., 2005; Janssen, 2006) y también en estos suelos según los resultados obtenidos por Orlando (2008). Respecto a los bacteroidetes, se detectaron pocos clones en la genoteca. Sin embargo el análisis de TRFLP revela que aquellos TRFs identificables como bacteroidetes fueron abundantes en términos de su fluorescencia relativa, esto indicaría que este grupo tiene poca diversidad en términos de riqueza, pero son grupos importantes en términos de abundancia.

En prácticamente todos los tiempos y tratamientos, pero en menor abundancia que los bacteroidetes y proteobacterias, se identificaron TRFs representantes del grupo firmicutes. Trabajos anteriores usando TRFLP para caracterizar la diversidad bacteriana de suelo proveniente del mismo matorral esclerófilo, muestran una dominancia de este grupo, además de una serie de TRFs que no pudieron ser identificados en las bases de datos (Farías y col., 2009).

De este análisis puede desprenderse que muchos TRFs teóricos quedan bajo el nivel de detección de la técnica, el nivel definido como ruido, por lo cual no pueden ser atribuidos esos fragmentos a grupos bacterianos. Por ejemplo, los gemmatimonadetes analizados presentan fragmentos terminales menores a 20 pb, lo cual los deja inmediatamente fuera de los grupos representados, al comenzar la discriminación de



TRFs sobre 30 pb para descartar restos de partidores que pudiesen haber quedado libres. Por otro lado, dado que el porcentaje de organismos cultivados es muy bajo, es difícil identificar gran parte o una fracción importante de los TRFs, sin embargo la idea de esta técnica es hacer una aproximación más que llegar a identificar filogenéticamente, es una técnica de *fingerprint* (Liu y col., 1997; Marshall, 1999) que, como su nombre lo dice, busca sacar una "fotografía instantánea" de la comunidad en cierto tiempo, lo cual puede darnos una idea rápida de su diversidad y estructura.

Es necesario mencionar que como parte de las limitaciones de las técnicas moleculares, los organismos que están en menor proporción podrían ser más sensibles a los cambios aplicados en los microcosmos y podrían estar siendo sub-representados, como un sesgo de la obtención del DNA y del PCR (Head y col, 1998; Ben-Dov y col., 2006; Carrigg y col, 2007). Existen limitaciones teóricas y prácticas que han dificultado la cuantificación de la diversidad bacteriana y que han impedido estudiar extensivamente los patrones de biodiversidad bacteriana (Horner-Devine y col., 2003). Estas limitaciones incluyen una pequeña proporción de especies bacterianas que pueden ser cultivadas (Brock, 1987), el gran número de individuos presente en muestras ambientales (Torsvik y col., 1990), la alta diversidad presente a pequeña escala (Klug y Tiedje, 1993) y la dificultad de definir especies bacterianas (Goodfellow y O'Donnell, 1993; Rosselló-Mora y Amann, 2001).

#### **4.3. Efecto de la disponibilidad de agua sobre la diversidad genética y metabólica de la comunidad bacteriana de suelo semiárido**

Para evaluar el efecto de la disponibilidad de agua se construyó un microcosmos al que se le aplicaron pulsos de agua cada 14 días, el cual se contrastó con un control sin tratamiento. Austin (2004) describe que la disponibilidad de agua, de forma episódica, afecta el ciclado de elementos en ecosistemas semiáridos, y que esto tiene consecuencias sobre la biota al incrementar la accesibilidad a los sustratos orgánicos. Por otro lado, Zhou y col. (2004) señalan que la matriz de suelo es capaz de sostener una alta diversidad dada la heterogeneidad de recursos y el aislamiento espacial que la caracteriza. Sin embargo, de acuerdo a lo indicado por este autor, un régimen de pulsos de agua continuo disminuiría ese aislamiento espacial, con lo cual sería esperable un aumento de la competencia por los recursos que finalmente podría reducir la diversidad. Bell (2008) señala que cualquier acumulación de nutrientes en el suelo como consecuencia de mineralización, causada por pulsos de humedad, debe subsecuentemente influenciar la dinámica funcional y alterar la diversidad de la comunidad bacteriana.

En este trabajo se estudió el efecto de los pulsos de agua sobre la diversidad genética y metabólica de la comunidad bacteriana de un suelo semiárido. Para esto se usó una aproximación independiente de cultivo que da cuenta de los polimorfismos a nivel genético, TRFLP (Liu y col., 1997), y una aproximación dependiente parcialmente de cultivo que da cuenta de distintos perfiles fisiológicos de la comunidad como resultado de polimorfismos a nivel metabólico, CLPP (Garland y Mills, 1991).

Si se observan los perfiles de TRFLP (Figura 6) y la utilización de fuentes de carbono (Tabla 11), pareciera ser que no hay diferencias importantes entre el suelo tratado con pulsos de agua y el suelo control, lo cual indicaría que la comunidad sería resistente al nivel de perturbación aplicado o es muy resiliente de tal manera que recupera rápidamente su estructura genética y actividad metabólica (Allison y Martiny, 2008).

No obstante, el análisis de los perfiles de TRFLP muestra diferencias a nivel de la riqueza de los TRFs. De acuerdo a los parámetros ecológicos, las comunidades en estudio presentan un bajo rango de riqueza, esto indicaría que un cambio menor en el número de TRFs podría tener un efecto mayor en el índice de similitud de las muestras, de tal manera que la pérdida de algunos TRFs podría aumentar las diferencias entre los microcosmos controles y tratados. Este efecto en el índice de similitud podría explicar la separación de las muestras tratadas y controles en el dendrograma (Figura 7, Tabla 3). Por su parte, el análisis multivariado apoya la separación observada en el dendrograma y revela que el agrupamiento de las muestras está afectado por el contenido hídrico y el contenido de nitrato (Figura 8, Tabla 4). Otros estudios, realizados sobre un grupo bacteriano específico como el gremio de oxidadores de amonio, mostraron que la adición de pulsos de agua durante el periodo de incubación afecta principalmente la abundancia de los TRFs (Bustamante, 2010).

Cuando se comparan las comunidades tratadas versus las controles mediante los parámetros ecológicos de rango de riqueza, dinámica y organización funcional, no se observan diferencias a nivel genético (Figura 10). Sin embargo, a nivel metabólico

las comunidades tratadas presentan una leve disminución en la dinámica comparada con el control (Figura 18). Esto podría reflejar la presencia de una comunidad más estable, en términos de su metabolismo, como resultado de una leve disminución de la dinámica en una comunidad con rango de riqueza y organización funcional medios. En este mismo sentido, tal como describe Zhou y col. (2004), es posible que los pulsos de agua disminuyan la heterogeneidad espacial, lo cual en un tiempo inicial podría provocar un aumento de la competencia, pero a la larga, dado el régimen periódico de los ciclos de agua, podría llevar a una homogenización de la comunidad disminuyendo así su tasa de cambio en potencialidades metabólicas.

Aún cuando la perturbación aplicada no produce cambios a nivel de la organización funcional, los datos muestran que la comunidad en estudio está dominada por sólo algunos filotipos, dado que el 20% de los TRFs dan cuenta de casi el 70% de la fluorescencia del patrón de TRFLP, indicando que se trataría de una comunidad altamente especializada que podría ser sensible a perturbaciones. En términos metabólicos, la organización funcional muestra que también hay dominancia de ciertas funciones metabólicas, correspondiendo en este caso al 40% de las actividades, lo que sugiere que hay grupos funcionales que pueden permanecer en bajo número y usar los recursos disponibles (Marzorati y col., 2008). A modo de ejemplo, un comportamiento similar al descrito para el microcosmos de disponibilidad de agua, en términos de los parámetros ecológicos  $R_r$ ,  $D_i$  y  $O_F$ , sería el caso de una comunidad de bacterias oxidadoras de amonio presentes en un reactor de tratamiento de agua (Wittebolle, 2005). Tal como la matriz de suelo, este ambiente presenta una alta capacidad de carga, y una comunidad estable en composición de especies, donde existe una fracción dominante de especies resilientes, capaces de sobrellevar cierto nivel de

perturbación, esta dominancia y resiliencia implican una baja tasa de cambio de las potencialidades metabólicas dominantes y por ende una dinámica baja.

#### **4.4. Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno sobre la diversidad genética y metabólica de la comunidad bacteriana de suelo semiárido.**

Para evaluar el efecto del Nr ácido, se aplicó un tratamiento de 2x2 al inicio del experimento.

El análisis de agrupamiento de los perfiles de TRFLP, basado en la presencia/ausencia de TRFs, muestra que la adición de nitrógeno es la perturbación que promueve la separación entre las muestras controles y tratadas (Figura 12, tabla 7). Esto mismo se observa en términos de la abundancia de fragmentos a través del análisis multivariado (Figura 13, tabla 8), separación que es explicada por el contenido de nitrato. Antecedentes previos basados un análisis de restricción del gen del rRNA 16S (ARDRA) indican que la precipitación ácida de nitrógeno no revela diferencias en los perfiles de restricción derivados de la comunidad bacteriana del suelo, tanto para suelos semiáridos como áridos (Orlando, 2008), sin embargo estos perfiles tienen menor resolución que los TRFLP usados en este trabajo. Se ha descrito que el efecto interactivo de la heterogeneidad espacial de los suelos sumado a la deposición de nitrógeno tiene efectos particularmente fuertes en los microorganismos de suelos áridos y semiáridos, donde la distribución de la humedad de suelo y de los nutrientes es heterogénea (McCracking y col., 2008). Asimismo, algunos autores señalan que la deposición de nitrógeno puede incrementar las concentraciones de nitrógeno en el

suelo, alterando la composición de las comunidades de plantas y microorganismos; e influenciando las tasas de ciclado y retención de los nutrientes (Aber y col., 1998; Fenn y col., 2003; Siguenza y col., 2006; Wallenstein y col., 2006).

Cuando los perfiles de TRFLP se analizan en término de los parámetros ecológicos, las comunidades estudiadas exhiben una alta dinámica y organización funcional y éstas no se modifican por efecto de los tratamientos. Sin embargo, el rango de riqueza disminuye por efecto del tratamiento ácido (Figura 15) lo que indicaría que este parámetro afecta la capacidad de carga del ambiente (Marzorati y col., 2008). Estudios realizados sobre la comunidad microbiana del suelo en áreas colindantes a plantaciones de *Pinus pinea*, determinaron que esta intervención agrícola afectó la estructura de la comunidad y que el mecanismo por el cual este cambio aparecía es la disminución del pH del suelo (Iovieno y col., 2010). La reducción de la capacidad de carga del ambiente puede estar explicada por efecto del tratamiento ácido, ya que se ha descrito que este factor puede explicar la riqueza y diversidad de las comunidades del suelo (Fierer y Jackson, 2006). Para explicar el efecto de la alteración de la capacidad de carga de un ambiente, Brusetti y col. (2006) estudiaron una sucesión de bacterias ácido-lácticas, mediante LH-PCR, en el proceso de fermentación del maíz en condiciones secas y sin luz (situación óptima), en contraste a un ambiente de alto porcentaje de humedad y oxígeno (proceso desfavorable). En este caso, el cambio entre las condiciones ambientales óptimas y desfavorables, produce una diferenciación entre los rangos de riqueza de la comunidad de bacterias ácido-lácticas, disminuyendo entonces la capacidad de carga del ambiente al aumentar las condiciones de humedad y oxígeno. Esto podría ser aplicable al caso de estudio de esta tesis, donde la aplicación de la solución ácida sería el factor que afectaría la capacidad de carga del

ambiente, disminuyendo el rango de riqueza en relación a los microcosmos que no reciben dicha perturbación.

El análisis de los perfiles de CLPP revela que el tratamiento ácido también afecta a la comunidad, en este caso reduce la dinámica de las muestras tratadas, indicando que hay menos cambios en la actividad metabólica en tiempos de muestreo consecutivos, lo que podría estar dado por una menor actividad metabólica por efecto del tratamiento ácido. El pH del suelo afecta la forma química, la concentración y la disponibilidad de los sustratos (Kemmit y col., 2006), y de esta manera influencia el crecimiento y actividad celular (Nicol y col., 2008). Por ejemplo, la actividad de las bacterias oxidadoras de amonio se ve reducida por una disminución en el pH, al reducir la disponibilidad de  $\text{NH}_3$  a través de la ionización de este compuesto a la forma protonada  $\text{NH}_4^+$  (Frijlink y col., 1992).

Sin embargo es necesario hacer algunas consideraciones metodológicas para los resultados de los CLPP. El rango de riqueza medio es una respuesta a la oferta de fuentes de carbono entregadas en la placa, pues en el ambiente existe una variedad de fuentes mucho mayor y las ecoplacas sólo entregan una selección de las que podrían ser encontradas en cualquier ambiente (Preston-Mafham y col., 2002). Dado que en ningún caso hubo consumo de todas las fuentes de carbono, ninguno de los microcosmos alcanzó un nivel alto de rango de riqueza de funciones metabólicas. Respecto a la dinámica sucede algo similar, a pesar de que la dinámica no es baja, dada la oferta limitada de fuentes no son posibles demasiadas variaciones. Finalmente, la organización funcional a nivel metabólico habla de una comunidad equitativa funcionalmente, donde hay dominancia de ciertas funciones, pero que no

superan el 40%. Si bien el método de Biolog es limitado, como resultado no refleja el uso potencial de las fuentes de carbono por la comunidad bacteriana por completo (Bell, 2008; Orlando y col., 2007), incluso algunos autores señalan que los métodos moleculares son más discriminatorias que los enfoques fisiológicos y bioquímicos (Ramsey y col., 2006; Singh y col., 2006). Sin embargo, se reconoce la capacidad de esta aproximación de estimar la respuesta microbiana a modelos de varios tratamientos, perturbaciones o condiciones ambientales (Konopka y col., 1998; Smalla y col., 1998).

En resumen, las perturbaciones aplicadas a la comunidad del suelo tienen efecto en la diversidad genética y funcional de la comunidad bacteriana. Observamos que la comunidad responde a cambios en la disponibilidad de agua y precipitación de N<sub>r</sub> en condiciones ácidas, variando su riqueza y abundancia a nivel genético, y la dinámica a nivel metabólico. No obstante, cabe destacar que el efecto de una perturbación no siempre afecta directamente los componentes de la diversidad, por lo cual los datos deben ser analizados mediante distintos enfoques para revelar los efectos de las perturbaciones sobre las comunidades microbianas.



## 5. CONCLUSIONES

- La comunidad bacteriana del suelo semiárido estudiado presenta una alta diversidad. Los principales linajes obtenidos se relacionan con representantes de proteobacterias y acidobacterias, los dos grupos más representados en genotecas de suelos alrededor del mundo.
- La adición regular de pulsos de agua y la aplicación de  $N_r$ , afectan los perfiles de TRFLP que describen la diversidad genética de la comunidad del suelo de los microcosmos. Estas diferencias se expresan tanto en la abundancia como en la riqueza de filotipos. En relación a los parámetros ecológicos, el tratamiento ácido parece ser la perturbación que tiene mayor impacto sobre el rango de riqueza.
- A nivel metabólico no se detectan cambios por efecto de la adición de nitrógeno sobre los perfiles fisiológicos a nivel comunitario, sin embargo la adición periódica de agua y el pH ácido disminuyen la dinámica metabólica de la comunidad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aber JD, JM Melillo, KJ Nadelhoffer, J Pastor y RD Boone.** 1991. Factors controlling nitrogen cycling and nitrogen saturation in northern temperate forest ecosystems. *Ecol. Applic.* 1:303-315.
- Aber JD, W McDowell, K Nadelhoffer, A Magill, G Berntson, M Kamakea, S McNulty, W Currie, L Rustad, I Fernandez.** 1998. Nitrogen saturation in temperate forests; hypotheses revised. *BioScience* 48:921-934
- Adams MB.** 2003. Ecological issues related to N deposition into natural ecosystems: research needs. *Environ. Internat.* 29:189-199.
- Allison SD y JBH Martiny.** 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:11512-11519
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y DJ Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul SF, TL Madden, AA Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller y DJ Lipman.** 1997. Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Austin AT y OE Sala.** 2002. Carbon and nitrogen dynamics across a natural precipitation gradient in Patagonia, Argentina. *J Veg. Sci.* 13: 351-360.
- Austin AT, L. Yahdjian, JM Stark, J Belnap, A. Porporato, U. Norton, DA Ravetta y SM Schaeffer.** 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141:221-235.
- Bell C, N McIntyre, S Cox, D Tissue y J Zak.** 2008. Soil Microbial Responses to Temporal Variations of Moisture and Temperature in a Chihuahuan Desert Grassly. *Microb. Ecol.* 56:153-167.
- Belnap J.** 2001. Microbes and microfauna associated with biological soil crusts. En: Belnap J, Lange OL (eds), *Biological soil crusts: structure, function, and management*, vol 150. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 167-174
- Ben-Dov E, OH Shapiro, N Siboni y A Kushmaro.** 2006. Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6902-6906.
- Bewley RJ y G Stotzky.** 1983. Effects of combinations of simulated acid rain and cadmium or zinc on microbial activity in soil. *Environ. Res.* 31:332-339.
- Blackwood CB, T Marsh, SH Kim y EA Paul.** 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:926-932.

**Bothe H, G Jost, M Schloter, BB Ward y KP 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  $^{14}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ -labelled plant material. *Soil. Biol. Biochem.* 17:329-337.

**Braker G, HL Ayala-del-Río, AH Devol, A Fesefeldt y JM Tiedje.** 2001. Community structure of denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along redox gradients in Pacific northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1893-1901.

**Brock TD.** 1987. The study of microorganisms *in situ*: progress and problems. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 41:1-17.

**Brown JH, TJ Valone y CG Curtin.** 1997. Reorganization of an arid ecosystem in response to recent climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9729-9733.

**Brusetti, L, S Borin, D Mora, A Rizzi, N Raddadi, C Sorlini, y D Daffonchio.** 2006. Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:154-164.

**Buckley, D y T Schmidt.** 2001 The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microb. Ecol.* 42:11-21.

**Burke IC, WK Lauenroth, WJ Parton.** 1997. Regional and temporal variation in net primary production and nitrogen mineralization in grasslands. *Ecology* 78:1330-1340.

**Bustamante M.** 2010. Efecto de la disponibilidad de agua sobre la diversidad de bacterias oxidadoras de amonio de suelos áridos. Memoria de Título de Ingeniero en Biotecnología molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 64 pp.

**Calbrix R, L Laval, S Barray.** 2005. Analysis of the potential functional diversity of the bacterial community in soil: a reproducible procedure using sole-carbon-source utilization profiles. *Eur. J. Soil Biol.* 41:11-20.

**Carrigg C, O Rice, S Kavanagh, G Collins y V O'Flaherty.** 2007. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:955-964.

**Casamayor EO, R Massana, S Benlloch, L Ovreas, B Diez, VJ Goddard, JM Gasol, I Joint, F Rodriguez-Valera y C Pedros- Alío.** 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ. Microbiol.* 4:338-348.

**Carú M, G Mosquera, L Bravo, G Guevara, D Sepúlveda y A Cabello.** 2003. Infectivity and effectivity of *Frankia* strains from the Rhamnaceae family on different actinorrhizal plants. *Plant Soil* 251:219-225.

**CENMA. Centro Nacional del Medio Ambiente.** 2002. Estudio de la calidad del aire en regiones urbano industriales. <http://www.sinia.cl/1292/article-28395.html>

**Charney J, PH Stone y WJ Quirk.** 1975. Drought in the Sahara: A biogeophysical feedback mechanism. *Science* 187:434-435.

**Chávez M y 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.

**Clarke, K.R.** 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Aust. J. Eco.* 18:117-143.

**Coleman DC y WB Whitman.** 2005. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia* 49:479-497.

**Degens BP y GP Sparling.** 1995. Repeated wet-dry cycles do not accelerate the mineralization of organic C involved in the macro-aggregation of a sandy loam soil. *Plant Soil* 175:197-203.

**Drees KP, JW Neilson, JL Betancourt, J Quade, DA Henderson, BM Pryor y RM Maier.** 2006. Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama desert, Chile. *Appl Environ Microbiol* 72:7902-7908.

**Dunbar J, SM Barns, LO Ticknor, CR Kuske.** 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3035-3045.

**Dunbar J, LO Ticknor y CR Kuske.** 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16SrRNA genes from bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:190-197.

**Ehleringer JR.** 2001. Productivity of deserts. *In:* HA Mooney y J Roy (Eds.), *Primary Productivity in Terrestrial Ecosystems.* Academic Press, San Diego. pp 345-362.

**Ehrlich PR y AH Ehrlich.** 1992. The value of biodiversity. *Ambio* 21:219-226.

**Espinosa D y C Cordero.** 1995. Biodiversidad, instrumento para medir la vitalidad de la naturaleza. *La jornada ecológica. Suplemento de La Jornada.*

**Evans RD y J Belnap.** 1999. Long-term consequences of disturbance on nitrogen dynamics in an arid ecosystem. *Ecology* 80:150-160.

**Everett, KD, RM Bush, y AA Andersen.** 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:415-440.

**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.

Fenn ME, JS Baron, EB Allen, HM Rueth, KR Nydick, L Geiser, WD Bowman, JO Sickman, T Meixner, DW Johnson, P Neitlich. 2003. Ecological effects of nitrogen deposition in the western United States. *BioScience* 53:404-420.

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

Fisher FM, JC Zak, GL Cunningham, WG Whitford. 1988. Water and nitrogen effects on growth and allocation patterns of creosotebush in the northern Chihuahuan Desert. *J. Range Manage* 41:387-391.

Forster JC. 1995. Soil sampling, handling, storage and analysis. *In*: Alef K, P Nannipieri (Eds), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press Ltd., London, England. Academic Press, London, pp. 49-121.

Frijlink MJ, T Abee, HJ Laanbroek, W De Boer y WN Konings. 1992. The bioenergetics of ammonia and hydroxylamine oxidation in *Nitrosomonas europaea* at acid and alkaline pH. *Arch. Microbiol.* 157: 194-199.

Gajardo R. 1994. *La Vegetación Natural de Chile. Clasificación y Distribución Geográfica*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 165 pp.

Galloway JN, JD Aber, JW Erisman, SP Seitzinger, RW Howarth, EB Cowling, y JB Cosby. 2003. The nitrogen cascade. *Bioscience* 53:341-356.

Garland JL y A Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microb.* 57:2351-2359.

Gebauer RLE y JR Ehleringer. 2000. Water and nitrogen uptake patterns following moisture pulses in a cold desert community. *Ecology* 81:1415-1424.

Girvan MS, J Bullimore, JN Pretty, AM Osborn y AS Ball. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1800-1809.

Goodfellow, M y O'Donnell, AG. 1993 Roots of bacterial systematics. *In*: *Handbook of new bacterial systematics* (Eds. M. Goodfellow y A. G. O'Donnell), pp. 2-54. London: Academic.

Graff A y R Conrad. 2005. Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus sp.*) trees. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 401-415.

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

Gutiérrez JR, LE Aguilera, JJ Armesto. 1992. The effects of water and macronutrients addition on aboveground biomass production of annual plants in an old field from a coastal desert of north-central Chile. *Rev Chil. Hist. Nat.* 65:83-90.

- Hackl E, S Zechmeister-Boltenstern, L Bodrossy y A Sessitsch. 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5057-5065.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Sym. Series* 41: 95-98.
- Hartmann M, B Frey, R Kolliker y F Widmer. 2005. Semiautomated genetic analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *J. Microbiol. Methods* 61:349-360.
- Hartmann M, A Fliessbach, HR Oberholzer y F Widmer. 2006. Ranking the magnitude of crop and farming system effects on soil microbial biomass and genetic structure of bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 57:378-388.
- Head IM, JR Saunders y RW Pickup. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35:1-21.
- Holland SM. 2003. Analytic rarefaction software version 1.3. Disponible gratis en: <http://www.uqa.edu/strata/software/index.html>.
- Hooper DU y L Johnson. 1999. Nitrogen limitation in dryland ecosystems: responses to geographical and temporal variation in precipitation. *Biogeochemistry* 46:247-293.
- Horner-Devine MC, KM Carney y BJM Bohannan. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, p. 113-122.
- Horz HP, A Barbrook, CB Field y BJM Bohannan. 2004. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15136-15141.
- Housman DC, HH Powers, AD Collins y J Belnap. 2006. Carbon and nitrogen fixation differ between successional stages of biological soil crusts in the Colorado and Plateau Chihuahuan Desert. *J. Arid Environ.* 66:620-634.
- Iovieno P, A Alfani y E Bááth. Soil microbial community structure and biomass as affected by *Pinus pinea* plantation in two Mediterranean areas. *Appl. Soil Ecol.* 45:56-63
- Janssen PH. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Minireviews. Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1719-1728.
- Jukes TH y CR Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. *In*: HM Munro (Ed), *Mammalian protein metabolism*, pp 21-132. Academic Press, New York, N.Y.
- Kemmitt SJ, D Wright, KWT Goulding y DL Jones. 2006. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 38:898-911.
- Kieft TL, E Soroker, MK Firestone. 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. *Soil. Biol. Biochem.* 19:119-126.

- Klepac-Ceraj V, I Ceraj, MF Polz.** 2006. Clusterer: extendable java application for sequence grouping and cluster analyses. *OJB*, 7(1): 15-21.
- Konopka A, L Oliver, RF Turco.** 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microb. Ecol.* 35:103-115.
- Koutrakis P, SN Sax, JA Sarnat, B Coul, P Demokritou, P Oyola, J Garcia y E Gramsch.** 2005. Analysis of PM10, PM2.5, and PM2.5-10 concentrations in Santiago, Chile from 1989 to 2001. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 55:342-351.
- Kowalchuk GA y JR Stephen.** 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:485-529.
- Liu WT, TL Marsh, H Cheng y LJ Fomey.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522.
- Marilley L y M Aragno.** 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perene* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil Ecol.* 13:127-136.
- Marsh TL, P Saxman, J Cole y J Tiedje.** 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web based research tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3616-3620.
- Marzorati M, L Wittebolle, N Boon, D Daffonchio y W Verstraete.** 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol.* 10: 1571-1581.
- McCaig AE, LA Glover, JI Prosser.** 1999. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1721-1730.
- McCrackin ML, TK Harms, NB Grimm, SJ Hall y JP Kaye.** 2008. Responses of soil microorganisms to resource availability in urban, desert soils. *Biogeochemistry* 87:143-155.
- Moeseneder MM, JM Arrieta, G Muyzer, C Winter y GJ Herndl.** 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3518-3525.
- Nagy ML, A Perez y F Garcia-Pichel.** 2005. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54:233-245.
- Nelson DW.** 1983. Determination of ammonium in KCl extracts by the salicylate Method. *Commun. Soil Sci Plant Anal* 14:1051-1062.
- Nicol GS Leininger, C Schleper y J Prosser.** 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol.* 10: 2966-2978.

**Núñez I, E Gonzalez-Gaudio y A Barahona.** 2003. La biodiversidad: historia y contexto de un concepto. *INCI*. 28(7): 387-393. ISSN 0378-1844.

**Office for Interdisciplinary Earth Studies (OIES).** 1991. Arid Ecosystems Interactions: Recommendations for Drylands Research in the Global Change Research Program. OIES-Report 6. p. 81.

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

**Orlando J.** 2008. Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre la diversidad genética y funcional de la microbiota bacteriana de suelos áridos. Tesis Doctor en Ciencias mención Microbiología. 114 pp.

**Osborn AM, ERB Moore y KN Timmis.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2:39-50.

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

**Pennanen T, H Fritze, P Vanhala, O Kiikkilä, S Neuvonen y E Bååth.** 1998. Structure of a microbial community in soil after prolonged addition of low levels of simulated acid rain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2173-2180.

**Pesaro M, G Nicollier, J Zeyer y F Widmer.** 2004. Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2577-2587.

**Peterjohn WT y WH Schlesinger.** 1991. Factors controlling denitrification in a Chihuahuan desert ecosystem. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 55:1694-1701.

**Prescott CE y D Parkinson.** 1985. Effects of sulphur pollution on rates of litter decomposition in a pine forest. *Can. J. Bot.* 63:1436-1443.

**Preston-Mafham J, L Boddy, PF Randerson.** 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles-a critique. *FEMS Microb. Ecol.* 42: 1-14.

**Quaiser A, T Ochsenreiter, C Lanz, SC Schuster, AH Treusch, J Eck, C Schleper.** 2003. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol. Microbiol.* 50:563-575.

**Ramsey PW, MC Rillig, KP Feris, WE Holben y JE Gannon.** 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia* 50:275-280.

**Rossello-Mora, R y R Amann.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:39-67.



- Saitou N, M Nei.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sala O, Fs Chapin III, JJ Armesto, E Berlow, J Bloomfield, R Dirzo, E Huber-Sanwald, Lf Huenneke, Rb Jackson, A Kinzig, R Leemans, DM Lodge, HA Mooney, M Oesterheld, NL Poff, MT Sykes, BH Walker, M Walker y DH Wall.** 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1770-1776.
- Schimel DS y WJ Parton.** 1986. Microclimatic controls of nitrogen mineralization y nitrification in shortgrass steppe soils. *Plant Soil* 93:347-357.
- Schimel J.** 2004. Playing scales in the methane cycle: from microbial ecology to globe. *PNAS* 101:12583-12587.
- Schlesinger W.** 1997. *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change.* Academic Press Inc. London.
- Seneviratne R y A Wild.** 1985. Effect of mild drying on the mineralization of soil nitrogen. *Plant Soil* 84:175-179.
- Singh, JS y AK Kashyap.** 2006. Dynamics of viable nitrifier community, N-mineralization and nitrification in seasonally dry tropical forest and savanna. *Microbiol. Res.* 161:169-179.
- Siguenza C, DE Crowley y EB Allen.** 2006. Soil microorganisms of a native shrub and exotic grasses along a nitrogen deposition gradient in southern California. *Appl. Soil Ecol.* 32:13-26.
- Smalla K, U Wachterdorf, H Heuer, WT Liu y L Forney.** 1998. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1220-1225
- Stevens CJ, NB Dise, O Mountford y DJ Gowing.** 2004. Impact of Nitrogen Deposition on the Species Richness of Grasslands. *Science* 303:1876-1879.
- Tamura K, S Kumar, J Dudley y M Nei.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- ter Braak CJF. y P Šmilauer.** 2002. *CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5).* Microcomputer Power (Ithaca NY, USA), 500 pp.
- Thompson JD, TJ Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin y DG Higgins.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24:4876-4882.
- Tiedje JM, S Asuming-Brempong, K Nusslein, TL Marsh y SJ Flynn.** 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* 13:109-122.
- Torsvik, V, J Goksoyr y FL Daae.** 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.

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

**Vitousek PM, JD Aber, RW Howarth, GE Likens, PA Matson, DW Schindler, WH Schlesinger y DG Tilman.** 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Iss. Ecol.* 1:1-15.

**Wallenstein MD, S McNulty, IJ Fernandez, J Boggs y WH Schlesinger.** 2006. Nitrogen fertilization decreases forest soil fungal and bacterial biomass in three long-term experiments. *For. Ecol. Manage* 222:459-468

**Webster G, TM Embley y JI Prosser.** 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of  $\beta$ -protobacteria ammonia oxidizer populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:20-30.

**Weisburg WG, SM Barns, DA Pelletier y DJ Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.

**Widmer F, F Rasche, M Hartmann y A Fliessbach.** 2006. Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. *Appl Soil Ecol* 33: 294-307.

**Wittebolle, L, N Boon, B Vanparys, K Heylen, P De Vos y W Verstraete.** 2005. Failure of the ammonia oxidation process in two pharmaceutical wastewater treatment plants is linked to shifts in the bacterial communities. *J. Appl. Microbiol.* 99:997-1006.

**Yang JE, EO Skogley, BE Schaff, JJ Kim.** 1998. Simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62:1108-1115.

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

**Zhou J, B Xia, DS Treves, LY Wu, TL Marsh, RV O'Neill, AV Palumbo y JM Tiedje.** 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:326-334.

**Zhou J, B Xia, H Huang, AV Palumbo, JM Tiedje.** 2004. Microbial diversity y heterogeneity in sandy subsurface soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1723-1734.

**Zhou J, Y Huang, M Mo.** 2009. Phylogenetic analysis on the soil bacteria distributed in karst forest. *Braz. J. Microbiol.* 40: 827-837.

## ANEXO 1

**Tabla A1.** Parámetros edáficos medidos durante el periodo de incubación de los microcosmos

	pH <sup>a</sup>	ORP <sup>a</sup>	CH <sup>b</sup>	MO <sup>c</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sup>d</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sup>d</sup>
R-tH <sub>2</sub> O t0	6,29	118,87	39,41	4,52	16,67	37,20
R-tH <sub>2</sub> O t28	5,95	128,33	6,07	5,00	19,11	61,09
R-tH <sub>2</sub> O t42	5,69	120,67	3,34	5,31	5,68	89,08
R-tH <sub>2</sub> O t56	5,62	169,67	2,05	5,31	11,10	62,87
R-tH <sub>2</sub> O t84	5,45	161,00	2,15	4,31	3,24	63,17
R-tAc t0	6,28	118,20	37,52	4,31	15,45	37,76
R-tAc t28	6,10	133,00	4,26	5,35	20,33	56,82
R-tAc t42	5,77	128,00	2,23	5,33	2,02	86,50
R-tAc t56	5,78	185,67	1,78	5,46	6,03	51,47
R-tAc t84	5,47	200,67	2,10	4,33	8,13	53,34
R-tNr t0	6,38	118,63	43,71	4,93	30,09	56,52
R-tNr t28	6,14	136,33	4,17	5,32	38,14	90,86
R-tNr t42	5,88	143,33	2,19	5,13	13,01	126,20
R-tNr t56	5,70	194,33	1,68	5,66	21,23	98,61
R-tNr t84	5,46	201,00	2,10	4,47	19,11	94,64
R-tNrAc t0	6,32	124,73	38,37	4,80	41,07	49,87
R-tNrAc t28	5,99	153,00	9,46	4,92	10,08	109,92
R-tNrAc t42	5,57	160,67	3,96	5,21	0,00	117,27
R-tNrAc t56	5,53	205,67	1,94	5,63	12,36	87,39
R-tNrAc t84	5,51	211,67	2,21	4,46	0,00	88,18
R-tH <sub>2</sub> O (14) t0	6,57	182,23	15,01	6,04	29,12	22,22
R-tH <sub>2</sub> O (14) t28	6,64	174,97	15,73	6,06	23,63	78,66
R-tH <sub>2</sub> O (14) t42	6,57	137,47	15,29	5,68	0,00	92,42
R-tH <sub>2</sub> O (14) t56	6,69	139,33	15,57	5,81	9,52	92,19
R-tH <sub>2</sub> O (14) t84	6,77	189,17	16,83	5,91	0,00	114,16
R-s/t t0	6,51	172,83	4,39	6,01	21,59	19,04
R-s/t t28	6,64	170,10	2,29	6,73	34,34	24,00
R-s/t t42	6,69	149,80	2,34	5,69	3,14	23,57
R-s/t t56	6,09	159,60	2,54	5,66	14,77	25,58
R-s/t t84	6,70	183,23	2,40	5,87	0,00	24,05

pH; potencial de óxido reducción (ORP); contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); contenido de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

<sup>a</sup> Medidos por potenciometría.

<sup>b</sup> Determinado por gravimetría en base a ecuación CH = PH-PS/PS\*100 (PH: peso húmedo; PS: peso seco).

<sup>c</sup> Determinado por calcinación del suelo seco, en base a la ecuación MO = PS-PC/PC\*100 (PS: peso seco; PC: peso calcinado).

<sup>d</sup> Extracción de N mineral por modificación del protocolo de Forster (1995) y medido por métodos colorimétricos (Nelson, 1983; Yang y col., 1998).