

UCH-FC

Doc - Microbiología

D.F. 12

C.A.

**“EFECTO DE LA PRECIPITACIÓN ÁCIDA DE NITRÓGENO REACTIVO SOBRE
LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y FUNCIONAL DE LA MICROBIOTA BACTERIANA
DE SUELOS ÁRIDOS”**

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

**DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA
Facultad de Ciencias**



**Por
JULIETA LAURA ORLANDO JULIA**

Junio, 2008

**Directora de Tesis
DRA. MARGARITA CARÚ MARAMBIO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

JULIETA LAURA ORLANDO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 10 de junio de 2008.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Margarita Carú Marambio



COMISIÓN DE EVALUACIÓN DE TESIS:

Dr. Carlos Jerez Guevara





Dr. Víctor Cifuentes Guzmán



Dr. Davor Cotoras Tadic





A MI FAMILIA...
A MIS AMIGOS...
GRACIAS



RESUMEN BIOGRÁFICO

Nací en Capital Federal, Argentina, el 22 de agosto de 1979. Mi enseñanza media transcurrió en el Instituto Agrotécnico Rancul donde comencé a interesarme por la naturaleza y el medio ambiente. Sin saber qué estudiar cuando tuviera que empezar la importante etapa universitaria, me decidí por algo relacionado a la genética. La carrera que veía más adecuada en aquel momento de mi vida se dictaba sólo en la Provincia de Misiones por lo que decidí buscar algo relacionado para luego especializarme. Por fortuna, un Profesor me recomendó que estudiara Microbiología en la Universidad Nacional de Río Cuarto donde residía en esa época. Fue así que realicé los estudios para obtener el Título de Microbióloga que culminé a principios del año 2003. Realicé mi Tesis de Pregrado en Ecología Microbiana, bajo la dirección de la Dra. Lilia Cavaglieri, buscando un agente de control biológico para hongos fitopatógenos. Durante todo ese año trabajé *ad honorem* en el mismo laboratorio para fortalecer mi experiencia hasta que apareciera una nueva oportunidad. Paralelamente obtuve el título de Perito Clasificador de Cereales y Oleaginosas otorgado por SENASA. Finalizando el 2003 surgió la posibilidad de realizar el Doctorado en Microbiología en la Universidad de Chile a través de una beca DAAD. Por ello, en 2004 comencé una nueva etapa en Chile, trabajando también en un laboratorio de Ecología Microbiana pero esta vez con poblaciones bacterianas de suelo, especialmente las relacionadas con el ciclo del nitrógeno. Durante el desarrollo de esta Tesis, que fue supervisada por la Dra. Margarita Carú, realicé una Estadía de Investigación en el Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie de Marburg, Alemania, coordinada por la Dra. Gesche Braker.

AGRADECIMIENTOS



A mis padres, por apoyarme incondicionalmente en cada una de las decisiones que debo tomar. A mi mamá por su cariño y comprensión, por darme ánimos a cada momento y por intentar ayudarme aunque no entienda mucho lo que está haciendo. A mi papá por su apoyo en los momentos difíciles, por sus oportunas llamadas telefónicas, por su preocupación constante sobre mi bienestar.

A mis hermanos por todo lo compartido, por recibirme cada vez que pude visitarlos, por alegrarme cuando lo necesito, por enseñarme a convivir a pesar de las diferencias.

A mis sobrinos por alegrar mi vida, por sus sonrisas, sus llantos, sus caprichos, su cariño, por su apoyo inconsciente.

A Lilia, Ana, Romina, Natalia y Diego por ayudarme en el momento en que decidí probar suerte en Chile, por su confianza en mí y por seguir apoyándome a pesar de la distancia y el tiempo transcurrido.

A Felipe por ser un muy buen amigo, por estar siempre que lo necesito, por brindarme todo su apoyo y ofrecerme a su familia. A sus padres, que me han otorgado no sólo un espacio físico donde estar, sino que me han hecho sentir como en casa en todo sentido.

A Beba, por resolver tantos de los problemas domésticos que se presentaron durante mi estadía en Chile.

A mis compañeros del doctorado, con los que he superado cada una de las etapas de este Programa, por los momentos compartidos entre estudios, carretes, discusiones, lecturas, entre otras tantas cosas. A Erika, Merly, Claudio, Carla, Lina, Mauricio, Miguel, Jessica, Pablo, Mario. A Erika por su amistad, paciencia, por el respeto a las diferencias, por su tolerancia. A Merly por su amistad, por las noches enteras de estudio, por las largas conversaciones sobre diversos temas, por su compañía durante todo este tiempo. A Claudio por su amistad, las discusiones científicas, los copetes y cigarrillos compartidos y por salvar un par de experimentos con su ingenio.

A todas las personas del laboratorio de Ecología Microbiana, Profe, Juanita, Lorena, Pilar, Mónica, Rafael, Felipe, Marco, Fernanda, Catalina, Susana, Néstor, Mauricio, Natalia por hacer del laboratorio un ambiente agradable donde no sólo se trabaja sino que también se comparte un tiempo muy importante de nuestras vidas. A Juanita, Fernanda y Lorena, por su invaluable ayuda en la parte experimental de esta Tesis cuando se juntaban las muestras de los microcosmos. A Marco por su ayuda en la toma de muestras del desierto. A Rafael por las discusiones sobre el análisis de los datos y la corrección de las versiones preliminares de esta Tesis.

A la Dra. Margarita Carú por permitirme trabajar en su laboratorio, por su confianza en mis capacidades y por el valioso aporte a la realización de este trabajo.

A los Profes del Programa de Doctorado en Microbiología, a la Dra. Rosalba Lagos por su preocupación constante, a los Profes de la comisión de evaluación de esta Tesis, al Dr. Jerez, al Dr. Vázquez, al Dr. Cotoras y en especial al Dr. Cifuentes.

A la Escuela de Postgrado, en especial a Marisol, por los muchos trámites administrativos que han realizado.

Al Dr. Isaac por el préstamo de la mufla, a la Dra. Vila por el electrodo de potencial redox, a la Dra. Bono por el lector de placas, a la Sra. Patricia Corrales por el agua desionizada, al grupo del Dr. González por el asesoramiento en el análisis de TRFLP, a la Dra. Lamborot por los pañales de gasa, a los grupos del Dr. Jerez y del Dr. Cifuentes por varios reactivos.

A la Dra. Braker, por permitirme trabajar durante seis meses en su grupo de trabajo. Por el tiempo dedicado a mi capacitación y por sus consejos sobre el desarrollo de este trabajo. A toda la gente del Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie. A Kryssia y los demás latinos por hacer más llevadera mi estancia en Marburg, Alemania.

Al Servicio de intercambio académico alemán (DAAD) por financiar mi estadía en Chile y permitir la realización de mi doctorado. A los proyectos FONDECYT 1040880; DID-UCHile-ENL 07-16 y FONDECYT 1080280 por el apoyo económico para la realización de esta Tesis. A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) por otorgarme la beca para Estudios de Doctorado para Estudiantes Extranjeros en Chile 2008 (63080053).



ÍNDICE DE MATERIAS



LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Exposición general del problema y su relevancia	1
1.2. Antecedentes bibliográficos	6
1.2.1. <i>La microbiota de suelos áridos y semiáridos</i>	6
1.2.2. <i>El ciclo del nitrógeno y los grupos funcionales bacterianos</i>	8
1.2.3. <i>Precipitación de nitrógeno reactivo atmosférico</i>	11
1.2.4. <i>Efecto de los factores abióticos sobre la comunidad microbiana y los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno</i>	14
Hipótesis	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1. Recolección de muestras	18
2.2. Diseño y montaje de los microcosmos	20
2.3. Determinaciones físico-químicas	20

2.3.1. <i>Nutrientes disponibles (NPK y C:N)</i>	20
2.3.2. <i>Contenido hídrico</i>	21
2.3.3. <i>Materia orgánica</i>	21
2.3.4. <i>Contenido de nitrato y amonio</i>	21
2.3.5. <i>pH y potencial de óxido-reducción</i>	22
2.3.6. <i>Análisis de los datos</i>	22
2.4. <i>Ensayos de actividad</i>	23
2.4.1. <i>Nitrificación y amonificación</i>	23
2.4.2. <i>Desnitrificación</i>	23
2.4.3. <i>Análisis de los datos</i>	24
2.5. <i>Diversidad genética</i>	25
2.5.1. <i>Extracción del DNA</i>	25
2.5.2. <i>Amplificación por PCR</i>	25
2.5.3. <i>Clonación y secuenciación</i>	28
2.5.4. <i>Análisis filogenéticos de secuencias</i>	29
2.5.5. <i>Análisis de restricción del gen rDNA 16S (ARDRA)</i>	30
2.5.6. <i>Resolución por TRFLP del gen amoA</i>	31
2.5.7. <i>Estandarización y análisis de los perfiles de TRFLP</i>	32
2.5.8. <i>Relación entre diversidad genética y factores edáficos</i>	33
2.6. <i>Diversidad metabólica</i>	34
2.6.1. <i>Perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP)</i>	34
2.6.2. <i>Estimación de la diversidad metabólica de la comunidad</i>	35
2.6.3. <i>Relación entre diversidad metabólica y factores edáficos</i>	36



RESULTADOS	38
3.1. Composición de la comunidad bacteriana total, de las bacterias nitrificadoras y de las bacterias desnitrificadoras en el suelo semiárido del matorral y el suelo árido del desierto	38
3.1.1. <i>Composición de la comunidad bacteriana total</i>	38
3.1.2. <i>Composición de las bacterias nitrificadoras</i>	42
3.1.3. <i>Composición de las bacterias desnitrificadoras</i>	45
3.1.4. <i>Curvas de rarefacción</i>	48
3.2. Diseño de los microcosmos	49
3.3. Evaluación del efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre los parámetros edáficos y las actividades microbianas	50
3.3.1. <i>Factores edáficos</i>	50
3.3.2. <i>Actividades microbianas</i>	55
3.4. Evaluación del efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre la diversidad genética bacteriana	60
3.5. Evaluación del efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre la diversidad metabólica de la comunidad microbiana	67
DISCUSIÓN	76
4.1. Composición de la comunidad bacteriana total, de los nitrificadores y desnitrificadores en el suelo semiárido del matorral y el suelo árido del desierto	76
4.2. Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre los parámetros edáficos y las actividades microbianas	82
4.3. Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre la diversidad genética y metabólica de la comunidad microbiana	88
CONCLUSIONES	93
PROYECCIONES	94



BIBLIOGRAFÍA

96

ANEXOS



LISTA DE TABLAS

TABLA 1.	Partidores utilizados en la amplificación de los genes	25
TABLA 2.	Correlaciones de Pearson entre los parámetros edáficos de los microcosmos de suelo árido y semiárido	54
TABLA 3.	Coefficientes canónicos y de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los TRFLP del gen <i>amoA</i> , en los microcosmos de suelo árido y semiárido	67
TABLA 4.	Coefficientes canónicos y de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los CLPP, en los microcosmos de suelo árido y semiárido	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Esquema del proceso de nitrificación	9
FIGURA 2.	Esquema del proceso de desnitrificación	11
FIGURA 3.	Esquema de las emisiones, deposición y efectos de la precipitación de nitrógeno reactivo ácido	13
FIGURA 4.	Ubicación geográfica del lugar de procedencia de las muestras de suelo semiárido (matorral)	19
FIGURA 5.	Ubicación geográfica del lugar de procedencia de las muestras de suelo árido (desierto)	19
FIGURA 6.	Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen rDNA 16S del suelo semiárido (matorral)	40
FIGURA 7.	Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen rDNA 16S del suelo árido (desierto)	41
FIGURA 8.	Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen <i>amoA</i> del suelo semiárido (matorral)	43
FIGURA 9.	Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen <i>amoA</i> del suelo árido (desierto)	44
FIGURA 10.	Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen <i>nirK</i> del suelo semiárido (matorral)	46
FIGURA 11.	Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen <i>nirS</i> del suelo semiárido (matorral)	47
FIGURA 12.	Curvas de rarefacción para los genes rDNA 16S, <i>amoA</i> , <i>nirK</i> y <i>nirS</i> del suelo semiárido (matorral); y para los genes rDNA 16S y <i>amoA</i> del suelo árido (desierto)	48
FIGURA 13.	Parámetros edáficos determinados durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral) y árido (desierto)	51
FIGURA 14.	Contenido de nitrato para cada tratamiento durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral) y árido (desierto)	55
FIGURA 15.	Tasas de amonificación, nitrificación y desnitrificación durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral)	

	y árido (desierto)	57
FIGURA 16.	Recuperación de la actividad potencial de desnitrificación inicial por rehidratación de las muestras al final de la incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral) y árido (desierto)	59
FIGURA 17.	Diversidad genética de la comunidad bacteriana total determinada mediante ARDRA con la enzima <i>HaeIII</i> durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral) y árido (desierto)	60
FIGURA 18.	Frecuencia relativa de los principales TRFs obtenidos para el gen <i>amoA</i> a diferentes tiempos de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral) y árido (desierto)	62
FIGURA 19.	Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de los suelos semiárido (matorral) y árido (desierto) bajo cada tratamiento y durante la incubación de los microcosmos. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen <i>amoA</i> obtenidos con dos enzimas de restricción	64
FIGURA 20.	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP del gen <i>amoA</i> y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral) y árido (desierto)	66
FIGURA 21.	Curvas de diversidad metabólica de las comunidades (CMD) promedio para cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral)	69
FIGURA 22.	Curvas de diversidad metabólica de las comunidades (CMD) promedio para cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos de suelo árido (desierto)	70
FIGURA 23.	Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas del suelo semiárido (matorral) y árido (desierto) bajo cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos. Se usaron como base las fuentes de carbono utilizadas durante el ensayo de CLPP	72
FIGURA 24.	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles fisiológicos (CLPP) y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral) y árido (desierto)	74

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

AOB	Ammonia-oxidizing bacteria (Bacterias oxidadoras de amonio)
ARDRA	Amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis (Análisis de restricción del rDNA 16S amplificado)
BSA	Bovine serum albumin (Seroalbúmina bovina)
CH	Contenido hídrico
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxirribonucleótido trifosfato)
CCA	Canonical correspondence analysis (Análisis de correspondencia canónica)
CFU	Colony forming unit (Unidad formadora de colonia)
CLPP	Community-level physiological profiling (Perfil fisiológico a nivel comunitario)
CMD	Community metabolic diversity (Diversidad metabólica de la comunidad)
D	Suelo árido proveniente del Desierto de Atacama
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilen-diamino-tetracético)
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
M	Suelo semiárido proveniente del matorral esclerófilo de Chile Central
MO	Materia orgánica
MVSP	Multi-variate statistical package (Paquete de estadística multivariada)
NCBI	National center for biotechnology information (Centro Nacional para Información Biotecnológica)
NH ₄ ⁺	Contenido de amonio

NO ₃ ⁻	Contenido de nitrato
Nr	Nitrógeno reactivo
OD	Optical density (Densidad óptica)
ORP	Potencial de óxido-reducción
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline (Buffer fosfato salino)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PS	Peso seco
tAc	Tratamiento con solución ácida (pH 4.0) sin nitrato de amonio (0 µg g ⁻¹)
tH ₂ O	Tratamiento con agua desionizada
tNr	Tratamiento con solución neutra (pH 7.0) de nitrato de amonio (100 µg g ⁻¹)
tNrAc	Tratamiento con solución ácida (pH 4.0) de nitrato de amonio (100 µg g ⁻¹)
TRFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)
TRF	Terminal restriction fragment (Fragmento terminal de restricción)
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UF	Unidades de fluorescencia
UPGMA	Unweighted pair-group method with arithmetic mean (Método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética)

RESUMEN

La biogeoquímica global incluye numerosos procesos microbianos, los cuales dependen de diversos factores tanto bióticos como abióticos, entre ellos la disponibilidad de agua, de nutrientes como el nitrógeno y de la diversidad genética y funcional de la microbiota. Estos factores son limitantes para la productividad de muchos suelos, en especial en ecosistemas áridos y semiáridos donde se postula que, por su dependencia del régimen de precipitaciones, responderían rápidamente a los efectos del cambio climático. También se ha sugerido que estos ecosistemas serían más sensibles al ingreso o pérdida de nutrientes, como el nitrógeno, el cual podría modificar tanto la actividad como la diversidad de los grupos bacterianos que gobiernan este ciclo, especialmente por el considerable aumento global de Nitrógeno reactivo (Nr) en la biosfera, durante el último siglo, debido a la acción antropogénica. Una fracción de este Nr forma parte de la contaminación atmosférica, donde tiene un corto tiempo de residencia y la mayoría retorna al suelo en forma de precipitación ácida de Nr (nitrato y amonio). El ciclo del nitrógeno involucra diversas reacciones de óxido-reducción, como la fijación que reduce el nitrógeno atmosférico a amonio. Luego, durante la nitrificación, el amonio es oxidado a nitrato, el cual es posteriormente reducido a nitrógeno elemental mediante desnitrificación. En el suelo, los contenidos de amonio y nitrato dependen principalmente de estos procesos microbiológicos, realizados por grupos bacterianos específicos conocidos como fijadores de nitrógeno, nitrificadores y desnitrificadores. En consideración a lo anterior, este trabajo propuso evaluar el efecto de la

precipitación ácida de Nr sobre la diversidad genética y funcional de la comunidad bacteriana del suelo y cómo esta respuesta es mediada por el grado de aridez. Para ello se realizaron ensayos a nivel de microcosmos, incubados durante 84 días, con suelo árido proveniente del desierto de Atacama y suelo semiárido del matorral esclerófilo de Chile Central. Se evaluó el efecto del Nr ácido sobre los parámetros edáficos, las actividades microbianas de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno, la diversidad genética de nitrificadores y sobre la diversidad genética y metabólica de la comunidad bacteriana total. Paralelamente, mediante la construcción de genotecas con marcadores moleculares para cada grupo, se determinó la composición de la comunidad bacteriana total (rDNA 16S), de los nitrificadores (*amoA*) y desnitrificadores (*nirK* y *nirS*).

Los resultados indicaron que el suelo árido del desierto mostró mayor riqueza del rDNA 16S que el suelo del matorral semiárido, concordando con la postulación de que la falta de agua podría limitar la comunicación entre microhábitats, resultando en una mayor heterogeneidad espacial que disminuiría o anularía el efecto de la competencia. En ambos tipos de suelos, los clones del gen *amoA* se agruparon exclusivamente con bacterias del género *Nitrosospira*, sugiriendo que la nitrificación se trataría de una función poco redundante. En el suelo semiárido la diversidad genética del gen *nirS* fue mayor que la del gen *nirK*. Sin embargo, todos los clones del gen *nirK* se relacionaron con secuencias de clones ambientales o formaron grupos independientes sugiriendo una composición particular en estos suelos. Por el contrario, en el suelo árido no se detectó la presencia de genes de desnitrificadores, probablemente debido a una baja abundancia de este gremio bacteriano.

Los ensayos de microcosmos mostraron aumentos significativos en el contenido de nitrato y

en las tasas de amonificación, nitrificación y desnitrificación en los tratamientos conteniendo Nr. El tratamiento ácido a pH 4.0 no tuvo efecto sobre los parámetros edáficos ni sobre las actividades microbianas. La diversidad genética de la comunidad bacteriana, determinada por ARDRA, no se modificó con los tratamientos aplicados durante el tiempo de incubación. Los patrones de TRFLP del gen *amoA* no mostraron cambios significativos de la diversidad de las bacterias nitrificantes durante el tiempo de incubación con los distintos tratamientos. Sin embargo, los suelos mostraron diferente composición de nitrificadores, de acuerdo al análisis de correspondencia canónica, los factores edáficos que mejor explicaron estas diferencias fueron el pH y los contenidos de materia orgánica y nitrato. Por su parte la diversidad metabólica de la comunidad microbiana, medida como la capacidad de utilizar varias fuentes de carbono, fue diferente entre los suelos estudiados. El análisis de correspondencia canónica entre los perfiles metabólicos y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de ambos suelos reveló que las muestras se separaron de acuerdo al tipo de suelo y dentro de cada grupo según el tiempo de incubación de los microcosmos, independientemente del tratamiento. Los parámetros edáficos que mejor explicaron esta separación fueron el pH y la materia orgánica.

En conclusión, los resultados indican cierto grado de estabilidad de la diversidad genética bacteriana del suelo frente a los tratamientos ensayados, los cuales afectarían principalmente la actividad metabólica de la microbiota, en particular la actividad de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno. La presencia activa de estos gremios bacterianos sugiere que pueden desempeñar un importante papel en el balance de nitrógeno de estas zonas áridas y semiáridas, especialmente bajo condiciones de mayor disponibilidad de agua.

ABSTRACT

Global biogeochemistry includes numerous microbial processes which depend on diverse biotic as well as abiotic factors, amongst them, the availability of water, nutrients such as nitrogen and the genetic and functional diversity of the biota. These factors are limiting for the productivity of many soils, especially in arid and semiarid ecosystems where it is thought that, given its dependency on the rainfall regime, would respond rapidly to the effects of global climate change. It has also been suggested that these ecosystems are more sensible to the entry or loss of nutrients, such as nitrogen, which could modify the activity as well as the diversity of the bacterial groups that govern this cycle, especially due to the considerable global increase of reactive nitrogen (Nr) in the biosphere as a result of anthropogenic action during this last century. A fraction of this Nr forms part of the atmospheric contamination, where it has a short time of residence and a great part returns to the soil in the form of acid rain of Nr (nitrate and ammonium). The nitrogen cycle involves diverse oxidation-reduction reactions, such as fixation that reduces atmospheric nitrogen to ammonium. Then, during nitrification, the ammonium is oxidized to nitrate, which is subsequently reduced to elemental nitrogen by denitrification. In soil, the ammonium and nitrate contents mainly depend on these microbiological processes carried out by specific bacterial groups known as nitrogen fixers, nitrifiers and denitrifiers. In consideration of the aforementioned, this work proposed to evaluate the effect of acid rain of Nr on the genetic and functional diversity of the soil microbial community and how this response is mediated

by the degree of aridity. For this, assays were carried out at the level of microcosms, incubated for 84 days, with arid soil from the Atacama Desert and semiarid soil from the sclerophyllous matorral from central Chile. The effects of acid Nr on the edaphic parameters, the microbial activities of the functional groups of the nitrogen cycle, the genetic diversity of nitrifiers and on the genetic and metabolic diversity of the total bacterial community were evaluated. At the same time, through the construction of gene libraries with molecular markers for each group, the composition of the total bacterial community (rDNA 16S), of the nitrifiers (*amoA*) and denitrifiers (*nirK* and *nirS*) were determined.

The results indicated that the arid desert soil showed a greater richness of the rDNA 16S than the semiarid soil of the matorral, in accordance with the idea that the lack of water could limit communication between microhabitats, resulting in a greater spatial heterogeneity that would decrease or annul the effect of competition. In both types of soil, the *amoA* gene clones clustered exclusively with bacteria of the genus *Nitrosospira*, suggesting that nitrification is a function not very redundant. In semiarid soil, the genetic diversity of the *nirS* gene was greater than the *nirK* gene. However, all the clones of the *nirK* gene were related to sequences of environmental clones or formed independent groups, suggesting an exclusive composition in these soils. On the other hand, in the arid soil the presence of denitrifying genes was not detected possibly due to the low abundance of this bacterial guild.

The microcosms assay showed significant increases in the nitrate content and the rates of ammonification, nitrification and denitrification in the treatments containing Nr. The acid treatment at pH 4.0 had no effect on the edaphic parameters or the microbial activities. The

genetic diversity of the microbial community, determined by ARDRA, was not modified with the treatments applied during the incubation period. The TRFLP patterns of the *amoA* gene did not show significant changes in the diversity of the nitrifying bacteria during the incubation period with the different treatments. However, the soils showed a different nitrifying composition, according to the canonical correspondence analysis the edaphic factors that best explained these differences were the pH and the organic matter and nitrate content. In turn the metabolic diversity of the microbial community, measured as the capacity to utilize various carbon sources, was different between the soils studied. The canonical correspondence analysis between the metabolic profiles and the edaphic factors measured during the incubation period of the microcosms of both soils showed that the samples separated according to the type of soil and within each group according to the time of incubation of the microcosms, independent of the treatment. The edaphic parameters that best explained this separation were the pH and organic matter.

In conclusion, the results indicate a certain degree of stability of the bacterial genetic diversity of the soil in response to the treatments assayed, which would mainly affect the metabolic activity of the microbiota, particularly the activity of the functional groups of the nitrogen cycle. The active presence of these bacterial guilds suggests that they have an important role in the nitrogen balance of these arid and semiarid areas, especially under conditions of greater water availability.

INTRODUCCIÓN

1.1. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA Y SU RELEVANCIA

Los procesos microbianos dominan la biogeoquímica global. Éstos representan aproximadamente la mitad de la fotosíntesis y casi toda la descomposición de la materia orgánica, nitrificación, desnitrificación, producción de metano, entre otros (Schlesinger 1997). No obstante, el papel de la estructura y composición de los microorganismos en estos procesos ecosistémicos se considera frecuentemente una caja negra, aun cuando las variaciones de la estructura y fisiología de la microbiota pueden tener un gran impacto sobre los ciclos biogeoquímicos globales y los cambios climáticos (Schimel 2004).

Se ha postulado que las regiones áridas se encuentran entre los sistemas que más tempranamente responderían a los efectos del cambio climático debido a que los procesos ecosistémicos en ellos están estrechamente acoplados a las precipitaciones (OIES 1991). Los ecosistemas áridos, además, son altamente vulnerables a las perturbaciones introducidas por el hombre 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).

Estas regiones están distribuidas uniformemente entre las latitudes templadas y tropicales. Los sistemas áridos y los semiáridos representan un 19% y un 14,6% de los ecosistemas terrestres, respectivamente (Meigs 1953). En Chile las regiones áridas y

semiáridas cubren una superficie aproximada de 16,5 millones de hectáreas, las cuales representan el 22% del territorio nacional. Entre estas regiones, el desierto de Atacama y el matorral esclerófilo de Chile Central son dos ejemplos de suelos áridos y semiáridos. El desierto de Atacama se extiende desde los 5°S hasta los 27°S mientras que el matorral esclerófilo de Chile Central abarca desde los 32°S hasta los 36°S (Gajardo 1994).

Los ciclos de sequía y precipitación (“drying-rewetting”) son comunes en una variedad de ecosistemas (Kieft y col. 1987; Groffman y Tiedje 1988; Ryan y col. 1998; Pulleman y Tietema 1999) pero a menudo son más pronunciados en ecosistemas áridos y semiáridos con una precipitación fuertemente estacional (Austin y col. 2004). En estos ecosistemas 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), la abundancia de la microbiota (Singh y Kashyap 2006) y el ciclado de nutrientes (Schimel y Parton 1986; Gebauer y Ehleringer 2000), incluyendo 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. Aunque la productividad primaria de estos ecosistemas depende fuertemente de la disponibilidad de agua (Noy-Meir 1973; Lieth 1975; Webb y col. 1978; Sala y col. 1988), el nitrógeno disponible se considera también un factor limitante en este tipo de 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 interferencia antropogénica

ha generado un aumento de la producción y movilidad del Nr , produciendo una sobrecarga al ciclo que ha contribuido a la acidificación, fertilización y eutrofización de diferentes ecosistemas (Vitousek y col. 1997; Galloway y col. 2003). A su vez, la precipitación del Nr 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 ciclado 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 una de las causas de la extinción de especies (Sala y col. 2000; Stevens y col. 2004).

El ciclo del nitrógeno involucra una variedad de reacciones de óxido-reducción, realizadas principalmente por bacterias. A nivel biogeoquímico, el conjunto de microorganismos que participan en la conversión de un compuesto en otro son tratados como grupos funcionales o gremios, más que como unidades taxonómicas (Vitousek y Hooper 1994; Meyer 1994). Tres grupos funcionales microbianos participan para llevar a cabo las principales etapas del ciclo del nitrógeno: las bacterias fijadoras de nitrógeno, las bacterias nitrificadoras y las bacterias desnitrificadoras.

En el período pre-industrial el nitrógeno era el factor limitante más importante para la productividad de los ecosistemas terrestres, pero en el último siglo el aporte de nitrógeno vía fertilizantes y precipitación desde la atmósfera se ha incrementado a escala global con alteraciones considerables del ciclo biogeoquímico (Galloway 1995). Por lo tanto, el estudio

de los grupos funcionales implicados en el ciclo del nitrógeno cobra mayor relevancia ya que este ciclo es uno de los más perturbados por acción antropogénica (Vitousek y col. 1997). No obstante, el estudio de la diversidad microbiana en general, y de los grupos funcionales en particular, ha estado sesgado por las técnicas dependientes de cultivo. Se estima que entre un 0,1-1% de las bacterias presentes en el suelo no pueden ser cultivadas por métodos tradicionales (Amann y col. 1995), limitando el conocimiento del papel que esta diversidad pudiera tener sobre el ecosistema (Torsvik y Øvreås 2002). Las nuevas posibilidades tecnológicas, a través de marcadores genético-moleculares, permiten acceder directamente a los microorganismos sin necesidad de aislarlos y preservarlos como cultivo puro (Hugenholtz y Pace 1996; Akkermans 1998; Ranjard y col. 2001).

Hay escasa o nula información sobre el efecto de la precipitación de Nr ácido sobre la diversidad genética y funcional de la microbiota de ecosistemas áridos o semiáridos porque generalmente se considera que el ciclo del nitrógeno está limitado, debido principalmente a la reducida actividad microbiana como consecuencia del bajo contenido hídrico (Otter y Scholes 2005). El ingreso natural de Nr a los ecosistemas áridos ocurriría principalmente por Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) de cianobacterias presentes en costras biológicas del suelo (Yeager y col. 2004; Nagy y col. 2005). Sin embargo, éstas son escasas en muchos ecosistemas desérticos o están limitadas a algunos sectores como ocurre en el Desierto de Atacama (Büdel 2003), por lo que la precipitación atmosférica sería actualmente la fuente dominante de ingreso de nitrógeno a estos ecosistemas (Schwinning y col. 2005). En los suelos semiáridos, como el matorral esclerófilo cercano a Santiago, la incorporación de nitrógeno sería en parte por FBN de bacterias diazótroficas 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. Cabe mencionar que el pH ácido es la principal causa de disminución de diversidad a nivel de la microbiota bacteriana del suelo (Fierer y Jackson 2006):

De acuerdo a los antecedentes expuestos, esta tesis propone responder si la precipitación de nitrógeno reactivo ácido es capaz de modificar la diversidad y función de la microbiota bacteriana y el reciclaje del nitrógeno en suelos áridos y semiáridos. Además se propone determinar si la respuesta observada depende del grado de aridez del suelo. Estas preguntas tienen relevancia en el contexto del cambio climático donde modificaciones a nivel de la microbiota pueden alterar la biogeoquímica y el funcionamiento ecosistémico.

Para abordar este problema se realizaron ensayos de microcosmos con suelos áridos derivados del desierto de Atacama (III Región) y suelos semiáridos provenientes del matorral esclerófilo de Chile Central (Región RM). Cabe destacar que 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.

Por otra parte, el ensayo en microcosmos permite disponer de un sistema controlado y reproducible que intenta simular los procesos e interacciones de componentes en una fracción del ambiente estudiado (Gillett y Witt 1980). Si bien el uso de microcosmos, como herramienta para estudiar procesos ecosistémicos, ha sido criticado por estar temporalmente limitados y no reflejar las complejas relaciones entre especies que tienen lugar en el medio

natural (Gillett y Witt 1980), este argumento no se aplica a los microorganismos donde las escalas temporales y espaciales son mucho más reducidas (Garland 1997; Prosser y col. 2003) y por tanto esta aproximación resulta útil (Gillett 1989) para responder las interrogantes planteadas.

1.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.2.1. La microbiota de suelos áridos y semiáridos.

La mayor parte de los trabajos sobre la microbiota del suelo de ecosistemas áridos y semiáridos se ha centrado en las costras biológicas (Belnap y Eldridge 2003; Belnap y col. 2004; Cable y Huxman 2004; Yeager y col. 2004; Nagy y col. 2005; Stursova y col. 2006) o sobre las comunidades microbianas asociadas a las plantas que representan islas de fertilidad en estos ecosistemas (Zak y col. 1994; Binkley y Giardina 1997; Sharma y col. 1998; McCully 1999; Bardgett y col. 2005; Waldrop y Firestone 2006; Orlando y col. 2007a). Si bien las islas de fertilidad presentan un mayor contenido de nutrientes (Johnson 1995; Schlesinger y col. 1996; Kieft y col. 1998; Erickson y col. 2005) y una mayor biomasa microbiana (Gallardo y Schlesinger 1992) que el suelo sin cobertura vegetal, varios trabajos demuestran que las comunidades asociadas a plantas fueron igualmente complejas que las presentes en suelo desnudo, aun cuando mostraron diferentes patrones de diversidad genética (Kuske y col. 2002; Farías 2006; Orlando y col. 2007a).

Los suelos de ecosistemas áridos se caracterizan por baja abundancia y actividad microbiana. Los valores de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (CFU g⁻¹) encontrados para poblaciones bacterianas aeróbicas en suelos áridos a través del mundo

varían entre menos de 10 a $1,6 \times 10^7$ (Bhatnagar y Bhatnagar 2005). Datos obtenidos por Navarro-González y col. (2003) en suelos hiperáridos de la localidad de Yungay, Desierto de Atacama, mostraron un bajo número de bacterias cultivables (<10 colonias sobre 100 placas sembradas) en el horizonte superficial del suelo (0-10 cm). En contraste, Maier y col. (2004) encontraron que las bacterias heterotróficas cultivables alcanzaron valores de $10^3 - 10^5$ CFU g⁻¹ en suelo de la misma localidad pero a una profundidad de 20-30 cm. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que las bacterias cultivables en suelos áridos de Sierra Pajarito (III región) fueron del orden de 10^6 CFU g⁻¹. Además, en estos suelos se detectó la presencia de bacterias oxidadoras de amonio pertenecientes a los géneros *Nitrosospira* y *Nitrosolobus* (Alfaro y col. 2006). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nejidat (2005) que encontró que el género *Nitrosospira* fue el principal oxidador de amonio en el suelo del Desierto de Negev. Por otro lado, estudios realizados en suelos hiperáridos del desierto de Atacama mostraron una dominancia de los *phyla* *Planctomycetes* y *Gemmatimonadetes* (Drees y col. 2006) que, según la literatura, no sobrepasan el 2% de los clones en la mayoría de los suelos (Janssen 2006). Esto sugiere que la microbiota de estos ambientes extremos tendría una composición particular que podría responder de manera diferente a las perturbaciones ambientales.

En sentido general, las comunidades microbianas de los suelos semiáridos del matorral han sido poco estudiadas. Algunos trabajos se han centrado en la diversidad microbiana de suelos semiáridos del chaparral de California (Fierer y col. 2005) y su respuesta a perturbaciones tales como incendios forestales (Mabuhay y col. 2004) y elevada concentración atmosférica de CO₂ (Lipson y col. 2005). En Chile, los estudios de las

comunidades microbianas de los suelos de matorrales semiáridos han estado restringidos al matorral xerofítico de Fray Jorge (Guevara 2007) y al matorral esclerófilo. En éste último los estudios se han limitado a la comunidad microbiana asociada a plantas actinorrícicas, donde se ha descrito la presencia de los principales grupos funcionales del nitrógeno (Chávez 2004; Chavez y Carú 2006; Farías 2006; Espinosa 2007; Orlando y col. 2007b). En estos suelos, las bacterias cultivables alcanzaron valores de 10^7 CFU g^{-1} (Orlando y col. 2007a). Los estudios de diversidad microbiana, mediante patrones de TRFLP, sugieren que la comunidad bacteriana estuvo compuesta principalmente por proteobacterias e indicaron que el suelo sin cobertura vegetal sustenta una mayor diversidad microbiana, comparada con aquella asociada a plantas actinorrícicas (Farías 2006). Estos antecedentes indican que los suelos semiáridos del matorral esclerófilo constituyen un sistema apropiado para estudiar el efecto de perturbaciones ambientales sobre la comunidad microbiana y sobre los principales grupos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno.

1.2.2. El ciclo del nitrógeno y los grupos funcionales bacterianos.

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno es importante en el sustento de los ecosistemas y las transformaciones en éste son principalmente realizadas por bacterias. Los compuestos intermediarios claves de este ciclo son el nitrógeno molecular (N_2), el amonio (NH_4^+), y el nitrato (NO_3^-) y los principales grupos funcionales comprenden a los fijadores de nitrógeno, los nitrificadores y los desnitrificadores.

Durante la nitrificación el amonio es convertido a nitrato, en un proceso que es llevado a cabo en dos etapas generándose inicialmente nitrito y luego, a partir de éste,

nitrato. Las bacterias nitrificadoras pueden ser divididas en dos grupos dependiendo de su sustrato. Las bacterias que oxidan amonio (AOB) a nitrito son denominadas con el prefijo Nitroso, mientras que las bacterias que oxidan nitrito (NOB) a nitrato se denominan con el prefijo Nitro (Madigan y col. 1999). Estos dos grupos actúan de forma secuencial en el proceso de nitrificación (Figura 1).

La oxidación del amonio es considerada la reacción limitante de la nitrificación y, por consiguiente, las AOB han recibido mayor atención en los últimos años (De Boer y Kowalchuk 2001). Las AOB son microorganismos químiolitoautotróficos que obtienen toda la energía para su crecimiento del acoplamiento de la oxidación del amonio al sistema de transporte de electrones. La enzima clave del proceso es la amonio monooxigenasa (AMO), y el gen que la codifica (*amoA*) se ha utilizado para analizar la composición y diversidad de este gremio (Kowalchuk y Stephen 2001; Norton y col. 2002; Nicolaisen y Ramsing 2002; Horz y col. 2004; Yeager y col. 2004; 2005).

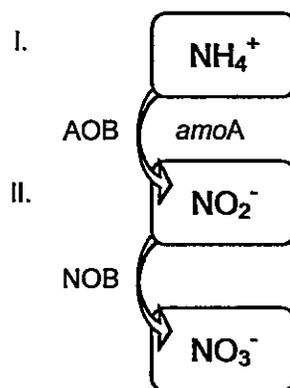


Figura 1: Esquema del proceso de nitrificación. I. Oxidación de amonio a nitrito catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (gen *amoA*) de las bacterias oxidadoras de amonio. II. Oxidación de nitrito a nitrato catalizada por la enzima nitrito reductasa de las bacterias oxidadoras de nitrito.

En ausencia de oxígeno, los iones nitrato pueden actuar como aceptores finales de electrones mediante el proceso que se conoce con el nombre de desnitrificación *sensu stricto*, reducción desasimilatoria de nitrato o respiración de nitrato. Durante esta etapa del ciclo, el nitrato es convertido sucesivamente a nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y, finalmente a nitrógeno molecular (Atlas y Bartha 2001) (Figura 2).

La capacidad de desnitrificar se encuentra distribuida en grupos filogenéticamente diversos pertenecientes a Bacteria y Archaea (Zumft y col. 1997; Braker y col. 1998; Braker y col. 2001; Priemé y col. 2002). En los suelos se reportaron como desnitrificadores, especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Azoarcus*, *Cupriavidus*, *Alcaligenes*, entre otros (Henry y col. 2006; Dandie y col. 2007). La enzima nitrito reductasa, cataliza un paso clave del proceso en el cual el nitrito es convertido en óxido nítrico y así el nitrógeno queda no disponible para la mayor parte de la biota (Grüntzing y col. 2001), siendo por ello considerada una enzima central del proceso (Ye y col. 1994).

La nitrito reductasa se encuentra en dos variantes estructuralmente diferentes pero que realizan la misma función fisiológica (Casciotti y Ward 2001), codificadas por los genes *nirK* y *nirS* (Zumft y col. 1997), los cuales han sido usados como blancos en los estudios de detección, cuantificación (Braker y col. 1998; Cho y Tiedje 2002) o caracterización de este grupo funcional (Braker y col. 2000; Braker y col. 2001; Casciotti y Ward 2001; Wu y col. 2001; Grüntzing y col. 2001; Rösch y col. 2002; Priemé y col. 2002; Sharma y col. 2005; Santoro y col. 2006).

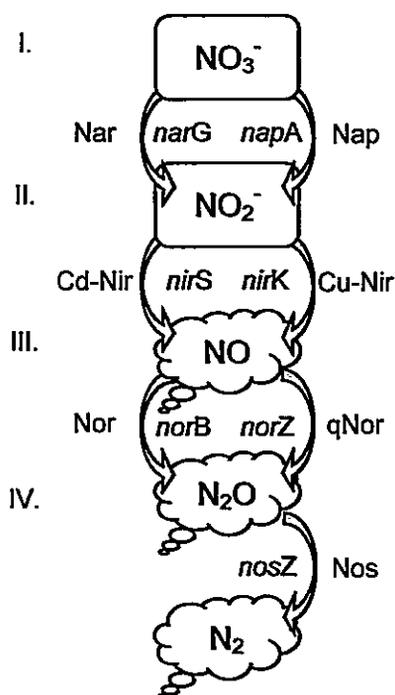


Figura 2: Esquema del proceso de desnitrificación. I. Reducción de nitrato a nitrito catalizada por la enzima nitrato reductasa unida a membrana (gen *narG*) o periplásmica (gen *napA*). II. Reducción de nitrito a óxido nítrico catalizada por la enzima nitrito reductasa unida al citocromo cd_1 (gen *nirS*) o a cobre (gen *nirK*). III. Reducción de óxido nítrico a óxido nitroso catalizada por la enzima óxido nítrico reductasa de un componente (gen *norB*) o de dos componentes (gen *norZ*). IV. Reducción de óxido nitroso a dinitrógeno catalizada por la enzima óxido nitroso reductasa (gen *nosZ*).

1.2.3. Precipitación de nitrógeno reactivo atmosférico

Las transformaciones y transferencia secuencial de Nr a través de los ecosistemas y los cambios que éstas pueden causar, se define como la cascada del nitrógeno (Galloway 1998). El término Nr incluye las formas reducidas y oxidadas del nitrógeno inorgánico y compuestos orgánicos nitrogenados, considerando al nitrógeno molecular (N_2) como no-reactivo.

La generación natural de Nr ocurre principalmente por FBN y en menor grado por descargas electrostáticas. Sin embargo, una fracción importante de Nr se produce por efecto antropogénico, el cual actualmente supera la FBN (Vitousek y col. 1997). El incremento global en la producción de Nr se debe a tres causas principales: i) cultivo extensivo e intensivo que promueve la conversión de N_2 a Nr mediante FBN, tal como leguminosas; ii) combustión de combustibles fósiles que convierte tanto el N_2 atmosférico como el Nr fósil, a óxidos de nitrógeno; y iii) fijación química de nitrógeno mediante el proceso Haber-Bosch, el cual convierte N_2 no-reactivo en NH_3 reactivo utilizado como fertilizante y en algunas actividades industriales (Galloway y col. 2003).

La generación de Nr inducida por cultivos incrementó desde aproximadamente 15 teragramos (Tg) de nitrógeno por año en 1860 a aproximadamente 33 Tg N año⁻¹ en el 2000; la producción por combustión de combustibles fósiles se incrementó desde menos de 1 Tg N año⁻¹ hasta aproximadamente 25 Tg N año⁻¹ en el mismo período; mientras que la producción por el proceso Haber-Bosch aumentó desde 0 Tg N año⁻¹ antes de 1910 a más de 100 Tg N año⁻¹ en el 2000. Así, entre 1860 y 2000, la producción antropogénica de Nr se incrementó desde aproximadamente 15 Tg N año⁻¹ a aproximadamente 165 Tg N año⁻¹ (Galloway y col. 2002). Una fracción del Nr forma parte del material particulado responsable de la contaminación atmosférica (Querol y col. 2001) donde, debido al corto tiempo de residencia y a la ausencia de desnitrificación, la mayoría de éste retorna a la superficie terrestre. Los principales compuestos nitrogenados que contaminan la atmósfera son: i) los óxidos de nitrógeno (NO_x) que en su mayoría son convertidos a ácido nítrico, el cual puede ser convertido en un aerosol (e.g. nitrato de amonio) y en estas formas

depositarse sobre el suelo o cuerpos de agua como consecuencia de las lluvias, o sedimentar como parte del material particulado; ii) las formas reducidas del nitrógeno (NH_y) que provienen principalmente de actividades agropecuarias y son depositadas o transformadas en aerosol de amonio (e.g. bisulfato de amonio, sulfato de amonio o nitrato de amonio) (Morales y Leiva 2006). Así, el Nr en forma de NO_x/NH_y puede ser transportado a grandes distancias y formar parte de la precipitación de nitrógeno en ecosistemas lejanos del lugar de origen (Asman y col. 1998; Galloway y col. 2003). Esta precipitación de Nr puede ser húmeda o seca y se conoce como “precipitación ácida” por los bajos valores de pH (<4.6) que presenta (Figura 3).

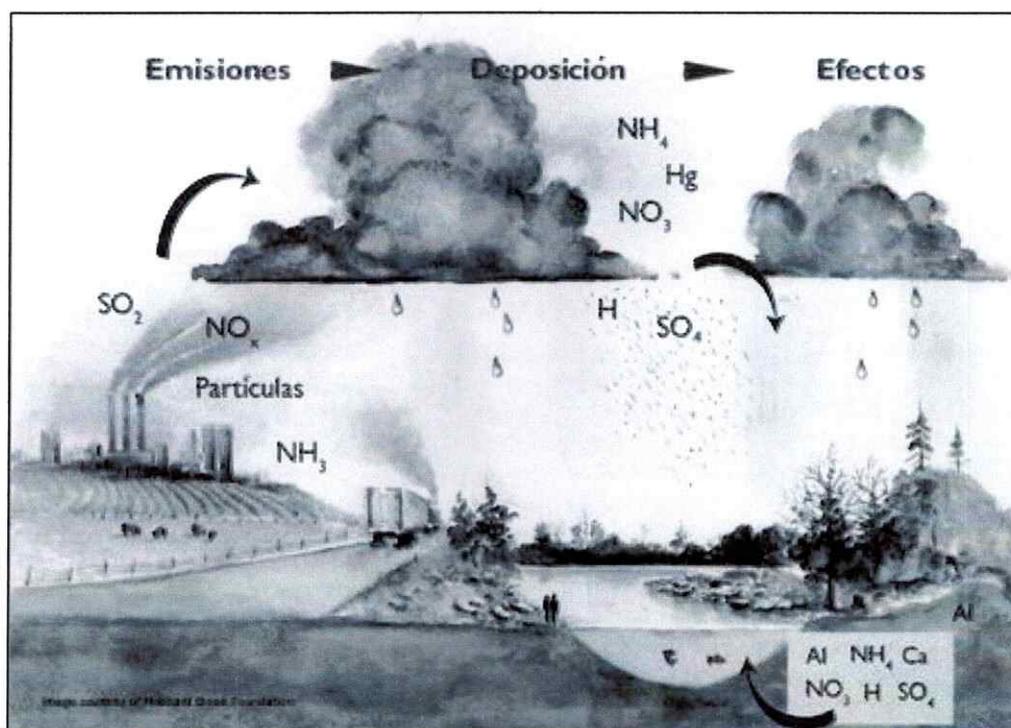


Figura 3: Esquema de las emisiones, deposición y efectos de la precipitación de nitrógeno reactivo ácido que contribuye a la acidificación, fertilización y eutrofización de diferentes ecosistemas. Modificado de Driscoll y col. (2001).

En ecosistemas con baja precipitación de nitrógeno se estima que ésta puede alcanzar entre $5-9 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, en contraste con los ecosistemas más perturbados donde puede alcanzar hasta $90 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Fenn y col. 2003). En Chile, hay poca información sobre la precipitación de nitrógeno, aunque existen varios estudios orientados a determinar la magnitud de la emisión de NO_x y NH_y en sectores urbanos (CENMA 2002; Koutrakis y col. 2005). En el valle longitudinal cerca de la ciudad de Osorno se ha estimado que, mediante precipitación húmeda, se depositan alrededor de $7,1 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, mientras que las tasas de precipitación en los bosques de la cordillera de Los Andes del mismo sector fueron de $3,4 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Oyarzún y col. 2002). Por otra parte, la cantidad de precipitación seca de N-NH_4 , en un área de pradera en el sur de Chile fue de $12,18 \text{ kg N ha}^{-1}$ durante seis meses (Godoy y col. 2005).

1.2.4. Efecto de los factores abióticos sobre la comunidad microbiana y los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno.

Según McCann (2000), la estabilidad de los ecosistemas depende de la habilidad de las comunidades de sustentar especies o grupos funcionales capaces de responder diferencialmente a factores bióticos y abióticos. Si a mayor biodiversidad se favorece la estabilidad ecológica, entonces la acelerada pérdida de especies puede desestabilizar o incluso llevar al colapso a ecosistemas completos. Si bien esta aseveración está pensada en términos de flora y fauna, podría también aplicarse a las comunidades microbianas. Zhou y col. (2002) sugieren que un bajo contenido hídrico podría explicar la alta diversidad encontrada en suelos con bajo contenido de carbono. Según estos autores la falta de agua

limitaría la comunicación entre microhábitats 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 unos recursos que son escasos pero, probablemente, heterogéneos. Estas condiciones permitirían el mantenimiento de comunidades más diversas y equitativas. Asimismo, el pH es considerado a nivel global el mejor descriptor de la diversidad y riqueza de 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).

Por otro lado, algunos antecedentes indican que existen 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). Sin embargo, hay escasos antecedentes sobre la composición y estructura de las comunidades bacterianas que habitan en suelos áridos y cómo se afectan por un ingreso de Nr ácido (Adams 2003).

En la mayoría de los ecosistemas terrestres, los suelos superficiales experimentan periodos de sequía seguidos por periodos relativamente rápidos de rehidratación. Sin embargo, los suelos de ecosistemas áridos son particularmente susceptibles a cambios en el estado de humedad debido a que los eventos de precipitación son infrecuentes y el clima seco y caluroso favorece la rápida desecación del suelo (Austin y col. 2004). Asimismo, algunos estudios demuestran que la adición de nitrato a suelos de praderas produjo cambios en la composición y actividad de las bacterias nitrificadoras, pero no en las abundancias del

gremio (Horz y col. 2004). En otros casos la adición de amonio no produjo cambios sobre la composición de las AOB, pero aumentó la nitrificación, la liberación de N_2O , y modificó la composición de bacterias desnitrificadoras (Avrahami y col. 2002). En suelos cultivados y fertilizados con nitrato de amonio, se observó una mayor tasa de nitrificación aparentemente por aumento en la abundancia de las AOB (Phillips y col. 2000). En suelos agrícolas se observó que las bacterias desnitrificadoras respondieron diferencialmente a fertilizantes orgánicos e inorgánicos, siendo mayor la desnitrificación con abonos orgánicos (Enwall y col. 2005; Kramer y col. 2006). Sin embargo, los cambios en estructura fueron sólo detectables cuando la fertilización orgánica produjo una disminución en el pH (Enwall y col. 2005).

Por lo tanto, modificaciones de estos factores abióticos podrían producir cambios en la abundancia y diversidad bacteriana e influir sobre los procesos microbianos que controlan, lo cual puede ser particularmente relevante para los grupos microbianos involucrados en las transformaciones del ciclo del nitrógeno, especialmente nitrificadores y desnitrificadores, ya que éstos tienen una baja redundancia funcional (Wolters y col. 2000). Los datos disponibles en la actualidad sugieren que las comunidades microbianas pueden ser consistentemente alteradas por cambios globales y que estos cambios pueden tener implicancia en los ciclos biogeoquímicos y en la función del ecosistema (Horz y col. 2004).

Por los antecedentes expuestos se propone la siguiente **HIPÓTESIS**:

Si los patrones de diversidad genética y metabólica dependen de las propiedades edáficas del suelo, entonces la microbiota bacteriana de ambos suelos será diferente en términos de composición y actividad metabólica y por ende responderán diferencialmente a la precipitación ácida de nitrógeno reactivo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la precipitación ácida de Nr sobre la diversidad y función de la microbiota bacteriana y cómo se correlacionan con los parámetros edáficos utilizando ensayos de microcosmos de suelos áridos y semiáridos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la composición de la comunidad bacteriana y de los gremios de bacterias nitrificadoras y desnitrificadoras en los suelos áridos y semiáridos.
2. Diseñar un ensayo de microcosmos y los tratamientos aplicados para evaluar el efecto de la adición de nitrógeno reactivo en condiciones ácidas sobre la microbiota bacteriana de suelos áridos y semiáridos.
3. Evaluar el efecto de los tratamientos aplicados sobre los parámetros edáficos, el contenido de amonio-nitrato y las actividades de los grupos funcionales del nitrógeno durante la incubación de los microcosmos de suelos áridos y semiáridos.
4. Determinar el efecto de los tratamientos aplicados sobre los patrones de diversidad genética y metabólica de la microbiota durante la incubación de los microcosmos de suelos áridos y semiáridos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de suelo para los ensayos de microcosmos se obtuvieron de:

a) Suelo semiárido, del matorral esclerófilo de la localidad "El Romeral" (33°48'S, 70°14'W), Cajón del Maipo, Región Metropolitana, Chile. El sector presenta un clima Mediterráneo seco con precipitaciones invernales con un promedio anual de 350 mm (Gajardo 1994) (Figura 4).

b) Suelo árido, del matorral subdesértico de "Sierra Pajarito" (27°59'S, 70°34'W), Desierto de Atacama, III Región, Chile. Este sector se caracteriza por un clima desértico árido con escasas precipitaciones que no superan los 20 mm en promedio anualmente (McKay y col. 2003) (Figura 5).

Las muestras se obtuvieron del horizonte superficial del suelo. En cada sitio de estudio se tomaron 10 muestras simples de suelo a 10 cm de profundidad. Teniendo en cuenta que el objetivo de este trabajo fue contrastar los ensambles microbianos en dos sistemas diferentes y en un ensayo de microcosmos, las muestras de cada sitio se homogeneizaron para obtener una muestra compuesta de cada uno con el objetivo de reducir la heterogeneidad espacial a pequeña escala según ha sido descrito por Webster y col. (2002) y Girvan y col. (2003). Las muestras se transportaron a 4°C y se realizó inmediatamente el montaje de los microcosmos.

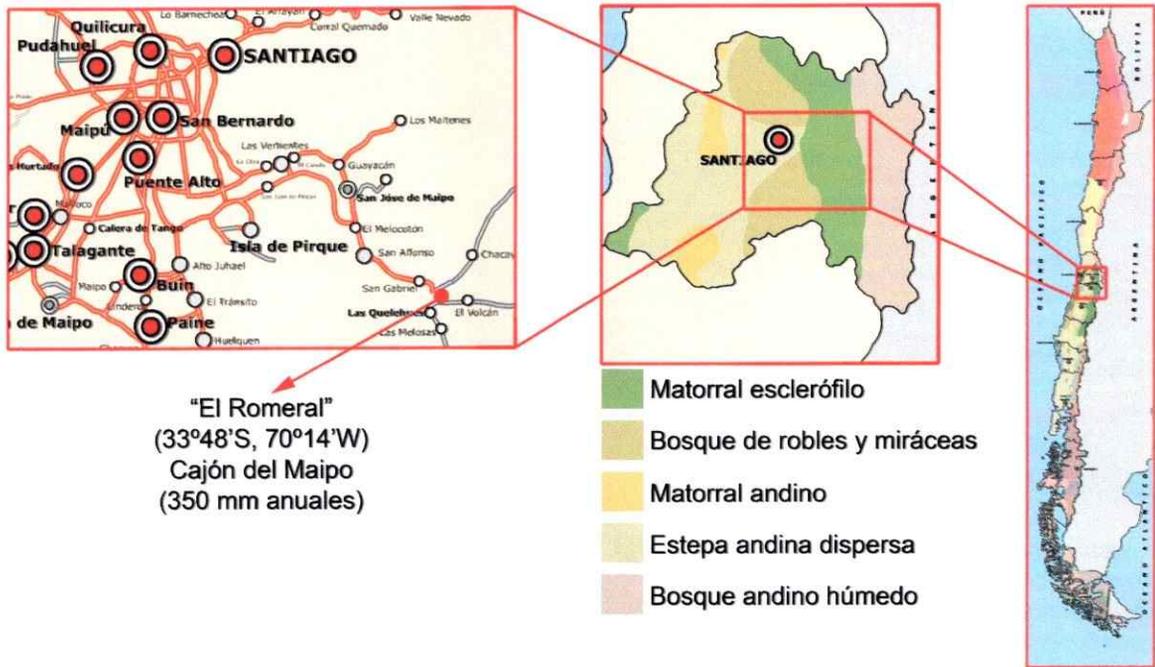


Figura 4: Ubicación geográfica del lugar de procedencia de las muestras de suelo semiárido: matorral esclerófilo de Chile Central.

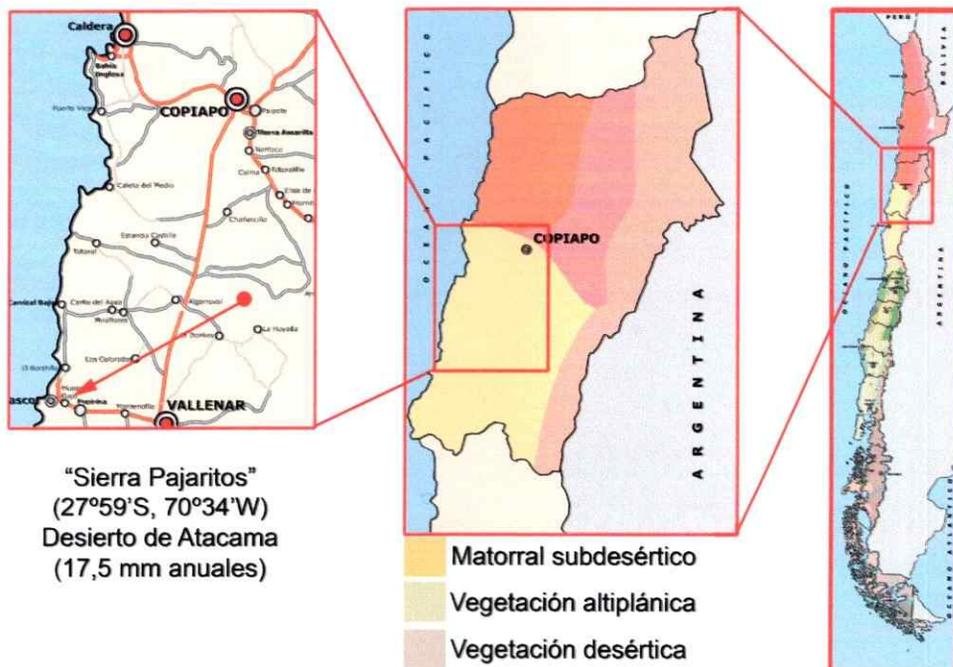


Figura 5: Ubicación geográfica del lugar de procedencia de las muestras de suelo árido: matorral subdesértico del Desierto de Atacama.

2.2. DISEÑO Y MONTAJE DE LOS MICROCOSMOS

Los microcosmos se construyeron a partir de las muestras de suelo semiárido del matorral (M) y árido del desierto (D) en recipientes plásticos con una relación 1:3 (v:v) suelo:aire y se mantuvieron a 25°C durante 84 días. Los tratamientos consistieron en la aplicación al inicio de la incubación de: i) agua desionizada (tH₂O); ii) solución ácida (pH 4.0) sin nitrato de amonio (tAc); iii) solución neutra (pH 7.0) de nitrato de amonio (100 µg g⁻¹) (tNr); iv) solución ácida (pH 4.0) de nitrato de amonio (100 µg g⁻¹) (tNrAc). Todos los tratamientos se aplicaron hasta alcanzar el 60% de la capacidad de retención de agua y se realizaron por triplicado.

Se tomaron submuestras de los microcosmos semanalmente para las determinaciones fisicoquímicas; cada 28 días para la determinación de la diversidad genética y para la medición de actividades (amonificación, nitrificación y desnitrificación); y a los 0, 42 y 84 días para determinar la diversidad metabólica. Al inicio y al final del experimento se determinó la disponibilidad de nutrientes (NPK y relación C:N).

2.3. DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS

2.3.1. *Nutrientes disponibles (NPK y C:N)*

El contenido de nitrógeno y carbono total de las muestras se determinó por combustión rápida en un analizador de elementos NA2500 (Carlo-Elba, Milan, Italy). El fósforo se determinó mediante el método de azul de molibdeno y el potasio por fotometría de llama (Forster 1995).

2.3.2. Contenido hídrico

El contenido hídrico (CH) del suelo se determinó por el método gravimétrico (Steubing y col. 2002). De cada réplica de los microcosmos, se extrajo 1 g de suelo para determinar el peso húmedo (PH) y se secó en estufa a 65°C durante 24 h. Luego se determinó el peso seco (PS) y el contenido hídrico se calculó según la fórmula: $CH = PH - PS / PS * 100$.

2.3.3. Materia orgánica

El contenido de materia orgánica (MO) se determinó a partir de las muestras secas, luego de determinar el CH. Para ello las muestras se calcinaron en una mufia a 400°C durante 16 h y se determinó el peso del suelo calcinado (PC) (Steubing y col. 2002). El porcentaje de MO se calculó según la fórmula: $MO = PS - PC / PC * 100$.

2.3.4. Contenido de nitrato y amonio

La extracción de nitrógeno mineral se realizó según una modificación del protocolo descrito por Forster (1995). El equivalente a 1 g de PS de suelo de cada réplica de los microcosmos se agitó a 150 rpm durante 1 h a temperatura ambiente con 10 ml de KCl 2 M y 10 ml de agua desionizada para amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), respectivamente. Las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- se determinaron mediante métodos colorimétricos (Nelson 1983; Yang y col. 1998). Todas las determinaciones se realizaron en duplicado. Para la determinación de NH_4^+ , 100 μ l del extracto en KCl 2M se mezclaron con 5 ml de reactivo de color (salicilato de sodio 0,3 %, citrato de sodio 2,5 %, tartrato de sodio 2,5 % y 0,12 g de nitroprusiato de sodio en 1000 ml de agua desionizada) y se dejaron reposar 15 min. Se adicionaron a la mezcla 5 ml de solución alcalina de hipoclorito de sodio (NaClO 0,05 % y NaOH 0,75 M) y se dejó reaccionar durante 1 h. Las mediciones se realizaron en un

espectrofotómetro a 660 nm. Para la determinación de NO_3^- , a 1 ml del extracto en agua desionizada se agregaron 0,5 ml de solución TRI (salicilato de sodio 1 %, NaCl 0,2 % y sulfamato de amonio 0,1 % en solución de NaOH 0,01 M) y se mezcló totalmente. Se evaporó en estufa a 100°C durante 2 h y se dejó enfriar. Los residuos se resuspendieron con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Luego de 5 min se agregaron 5 ml de agua desionizada y se dejó reposar hasta que la solución se enfrió. Finalmente se adicionaron 5 ml de NaOH 40% y se realizó la lectura de cada determinación en espectrofotómetro a 410 nm.

El contenido de NO_3^- se corroboró mediante cromatografía iónica. El equivalente a 2 g de PS de cada microcosmos se suspendieron en 10 ml de agua desionizada y se agitaron a 150 rpm durante 1 h a 4°C. La suspensión de suelo se filtró y el nitrato se midió en un cromatógrafo iónico (Sykam, Fürstfeldbruck, Germany) equipado con un detector de conductividad S3111 y un detector UV/vis UVIS204. Las condiciones de operación fueron: columnas de acero inoxidable, Na_2CO_3 5 mM como eluyente, tasa de flujo de aproximadamente $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ y temperatura del horno de 70°C. Los datos se evaluaron con el programa Peak simple versión 2.66 (SRI Instruments, Torrence, USA).

2.3.5. pH y potencial de óxido-reducción

El pH y el potencial de óxido-reducción (ORP) se determinaron potenciométricamente a partir de los extractos en KCl y agua (Steubing y col. 2002).

2.3.6. Análisis de los datos

Para establecer si hubo diferencias estadísticamente significativas en los parámetros edáficos (variables) entre los diferentes tratamientos en el tiempo (factores) se realizó un

análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos-vías) para cada suelo por separado usando el programa GraphPad Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

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

2.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD

2.4.1. Nitrificación y amonificación

La nitrificación neta (tasa de producción de nitrato) y la amonificación (tasa de producción de amonio) se estimaron mediante la pendiente de las curvas del contenido de nitrato y el contenido de amonio versus tiempo, respectivamente. Las tasas se calcularon cada 28 días y se expresaron en función del PS de la muestra de suelo ($\text{ng N g}_{\text{PS}}^{-1} \text{h}^{-1}$).

2.4.2. Desnitrificación

La desnitrificación potencial (tasa de producción de óxido nitroso) del suelo se determinó mediante un ensayo de inhibición de la actividad enzimática por acetileno (Smith y Tiedje 1979). En este ensayo el acetileno bloquea el paso de N_2O a N_2 , que cataliza la enzima óxido nitroso reductasa, produciéndose una acumulación de óxido nitroso (N_2O). La concentración de este gas se usa como medida de la tasa de desnitrificación. Una muestra equivalente a 5 g de PS de suelo se resuspendió en 5 ml de una solución con KNO_3 1 mM, glucosa 1 mM y 1 g L^{-1} de cloranfenicol, en frascos herméticamente cerrados con una atmósfera anaeróbica de N_2 . Luego se reemplazó por acetileno el 10% de la fase gaseosa y se incubó a 25°C con agitación durante 90 min tomando muestras cada 30 min. Las muestras

de gases se tomaron en tubos al vacío estériles y se analizaron inmediatamente. La cantidad de N_2O presente en las muestras se determinó en un cromatógrafo de gases GC8000 (Carlo Erba Instruments, Milan, Italy) equipado con un detector de captura de electrones (ECD). Las condiciones de operación fueron: columnas de acero inoxidable, N_2 como gas transportador, 5% CH_4 en 95% Ar como gas soporte, caudal aproximado 35 ml min^{-1} , temperatura del horno 50°C y temperatura del detector 350°C . Los datos se evaluaron con el programa Peak simple versión 2.66 (SRI Instruments, Torrence, USA). Estos ensayos fueron realizados en el Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Alemania.

Para calcular el N_2O producido se construyó una curva de calibración usando un estándar de concentración conocida. La tasa de producción de N_2O (tasa de desnitrificación) se estimó a partir de la pendiente de la curva de concentración de N_2O versus el tiempo de incubación y se expresó como $\text{ng N g}_{\text{PS}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

2.4.3. Análisis de los datos

Para establecer si hubo diferencias estadísticamente significativas en las actividades microbianas (variables) entre los diferentes tratamientos en el tiempo (factores) se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos-vías) para cada suelo utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

La correlación entre las actividades relacionadas al ciclo del nitrógeno (amonificación, nitrificación y desnitrificación) y el contenido hídrico se estableció mediante correlación de Pearson con el programa GraphPad Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

2.5. DIVERSIDAD GENÉTICA

2.5.1. Extracción del DNA

El DNA de las muestras de suelo se extrajo usando el FastDNA Soil Spin kit (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA) según indicaciones del fabricante y se conservó en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8.0). El DNA extraído se cuantificó y analizado a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, USA). La pureza del DNA se estimó por la razón de absorción a 260 y 280 nm.

2.5.2. Amplificación por PCR

En todas las amplificaciones se usaron como templado entre 10-50 ng de DNA genómico y se utilizó un volumen de reacción de 25 µl. En la Tabla 1 se resume la información de los partidores utilizados para la amplificación de cada gen.

Tabla 1: Partidores utilizados en la amplificación de los genes.

Gen	Partidor	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Tamaño ^c	Referencia
rDNA 16S	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	1504	Weisburg y col. 1991
	rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1492-1512		
amoA	AmoA-2F	AARGCGGCSAAGATGCCGCC	279-298	800	Webster y col. 2002
	AmoA-5R	TTATTTGATCCCCTC	1065-1079		
	AmoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	332-349	490	Rotthauwe y col. 1997
	AmoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	802-822		
nirK	NirK1F	GGMATGGTKCCSTGGCA	526-542	514	Braker y col. 1998
	NirK5R	GCCTCGATCAGRTTIRTGG	1023-1040		
nirS	Cd3aF	G TSAACG TSAAGGARACSGG	916-935	425	Michotey y col. 2000 Throbäck y col. 2004
	R3cd	GASTICGGRTGSGTCTGA	1322-1341		

^aM (A/C); K (G/T); S (C/G); R (A/G).

^bLas posiciones son indicadas para el gen rDNA 16S de *Escherichia coli* (AC000091), el gen *nirK* de *Alcaligenes faecalis* S-6 (D13155), el gen *nirS* de *Pseudomonas stutzeri* ZoBell (X56813) y el gen *amoA* de *Nitrosomonas europaea* (L08050).

^cEl tamaño del fragmento esperado está expresado en pares de bases.

El gen que codifica para el RNA ribosomal 16S se usó para estimar la diversidad de la comunidad bacteriana en las muestras de suelo. Para la amplificación de este gen se usaron los partidores fD1 y rP2 (Weisburg y col. 1991) (Tabla 1). La mezcla de reacción contenía ambos partidores a una concentración de 200 nM, 120 μ M de cada dNTP y 2,5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en amortiguador de PCR 1X, suplementado con $MgCl_2$ 2 mM y BSA a 120 μ g ml^{-1} en un volumen final de 25 μ l. El programa de amplificación constó de 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.

El gen *amoA* que codifica para la enzima amonio monoxigenasa se utilizó como marcador molecular de las bacterias oxidadoras de amonio y se amplificó usando una estrategia de PCR anidado (Yeager y col. 2005). Para la primera amplificación se utilizaron los partidores *amoA*-2F y *amoA*-5R (Tabla 1) a una concentración de 230 nM. Posteriormente 2 μ l de una dilución 1:10 del producto de la primera reacción se usó como templado en un segundo PCR con 660 nM de los partidores *amoA*-1F y *amoA*-2R (Tabla 1). En ambas reacciones los reactivos se usaron a las siguientes concentraciones: 200 μ M de cada dNTP, 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), amortiguador de PCR 1X y 1,5 mM de $MgCl_2$. Además, la mezcla se suplementó con 120 μ g ml^{-1} de BSA. La primera amplificación del gen *amoA* se realizó usando un método de *touchdown* (Webster y col. 2002) con los siguientes pasos secuenciales: 94°C por 5 min; 20 ciclos de 94°C por 40 s, 55°C por 50 s disminuyendo 0,5°C en cada ciclo hasta 45°C, 72°C por 1 min; luego 15 ciclos de 94°C por 40 s, 45°C por 50 s, 72°C por 1 min y una extensión final

de 7 min a 72°C. Los parámetros de amplificación de la segunda reacción fueron: 94°C por 5 min; 40 ciclos a 94°C por 45 s, 60°C por 1 min, y 72°C por 1 min; finalmente una extensión de 20 min a 72°C.

Los genes que codifican para las dos variantes de la enzima nitrito reductasa, *nirK* y *nirS*, se utilizaron como marcadores moleculares del grupo de desnitrificadores. En la amplificación del gen *nirK* se utilizaron los partidores nirK1F-nirK5R (Tabla 1) a una concentración de 400 nM. La mezcla de reacción además contenía 200 µM de cada dNTP, 1,25 U RedAccuTaq™ LA DNA polimerasa (Sigma-Aldrich Inc., Saint Luis, MO, USA), amortiguador de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂ y 400 ng µl⁻¹ de BSA. El programa de amplificación consistió de una etapa inicial a 94°C durante 3 min, seguida por 10 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s disminuyendo 0,5°C por ciclo y 72°C por 40 s, posteriormente 30 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 30 s y 72°C por 40 s, finalizando con una extensión final de 20 min a 72°C. El gen *nirS* se amplificó usando los partidores cd3aF y R3cd (Tabla 1) a una concentración de 400 nM. La mezcla de reacción se preparó usando las mismas condiciones que para el gen *nirK* pero con 1 µg µl⁻¹ de BSA. El programa de amplificación comenzó con una etapa de 2 min a 94°C seguida por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 57°C y 1 min a 72°C, la extensión final se realizó durante 20 min a 72°C. La amplificación de los genes de desnitrificadores fue realizada en el Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Alemania.

Para los análisis de restricción del gen rDNA 16S y de TRFLP del gen *amoA* la mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 µl que contenía GoTaq® Green Master Mix (GoTaq® DNA Polimerasa en 1X Green GoTaq® Reaction Amortiguador (pH

8,5), 200 μ M de cada dNTP y 1,5 mM $MgCl_2$) (Promega, Madison, WI, USA) y los partidores a las concentraciones descritas anteriormente. Los programas de amplificación fueron los descritos anteriormente excepto que la extensión final fue de 7 min para el gen rDNA 16S y de 10 min para el gen *amoA*. Para obtener los fragmentos de restricción terminal del gen *amoA* el partidore amoA-1F se marcó en el extremo 5' con FAM (6-carboxyfluoresceína).

Los productos de amplificación del DNA se observaron por electroforesis a 100 V durante 45 min en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM) teñidos con bromuro de etidio ($0,5 \mu g ml^{-1}$) y visualizados mediante luz ultravioleta. El DNA se cuantificó usando el programa UN-SCAN-IT gelTM versión 4.1 (Silk Scientific Inc. Orem, UT, USA). Para determinar el tamaño del fragmento se usó el marcador de peso molecular λ -HindIII y/o 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.5.3. Clonación y secuenciación

Se construyó una genoteca de cada uno de los genes amplificados. Para ello 100 ng de los productos de PCR se purificaron mediante el Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Los amplicones purificados de los genes rDNA 16S y *amoA* se ligaron en el vector pTZ57R/T y se clonaron en células competentes de *Escherichia coli* XL1B usando el InsTAcloneTM PCR Cloning Kit (Fermentas, Amherst, NY, USA) según las indicaciones del fabricante. Para los genes *nirK* y *nirS*, los amplicones se ligaron en el vector pGem[®]-T Easy y se clonaron en células competentes de *E. coli* JM109 usando el pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) según las indicaciones del fabricante.

Los transformantes se crecieron en medio LB (1,0% Triptona; 0,5% extracto de levadura; 1,0% NaCl; pH 7,0) y se seleccionaron por su resistencia a ampicilina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) y por su incapacidad de degradar el compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido) en presencia de IPTG (isopropil- β -D-tio-galactósido). Los clones seleccionados se resuspendieron en $10 \mu\text{l}$ de amortiguador TE. El DNA se obtuvo por lisis celular mediante 8 ciclos sucesivos de choques térmicos de 1 min a $98^\circ\text{C} / 4^\circ\text{C}$. La presencia del inserto esperado se determinó por PCR utilizando los partidores pUCF y pUCR para los genes rDNA 16S y *amoA*, mientras que la presencia de los insertos de los genes *nirK* y *nirS* se verificó utilizando los partidores M13F y M13R. La reacción contenía ambos partidores a una concentración de 120 nM, 1,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y $120 \mu\text{M}$ de cada dNTP en amortiguador de PCR 1X, suplementado con MgCl_2 2 mM y BSA a $120 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los productos de PCR que presentaron un tamaño de inserto esperado se secuenciaron (Macrogen Inc., Seoul, South Korea) en un solo sentido con el partidor fD1 para los clones del gen rDNA 16S, el partidor pUCF para el gen *amoA* y el partidor M13F para los genes *nirK* y *nirS* utilizando un Analizador Genético 3730XL (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Los clones secuenciados se guardaron en glicerol al 20% a -80°C (Sambrook y col. 1989).

2.5.4. Análisis filogenéticos de secuencias

Se construyeron seis genotecas, cuatro para el suelo semiárido (rDNA 16S, *amoA*, *nirK* y *nirS*) y dos para el suelo árido (rDNA 16S y *amoA*). Los genes *nirK* y *nirS* no pudieron ser amplificados desde las muestras de suelo árido. Las secuencias obtenidas se relacionaron con las disponibles en la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST-n

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y se seleccionaron aquellas que presentaron mayor identidad con los clones (>95%). Las secuencias se alinearon mediante la herramienta ClustalW del programa Bioedit versión 7.0.5.2 (Hall 1999) y se construyó un árbol filogenético para cada gen. Las distancias genéticas se calcularon usando el índice de Jukes y Cantor (Jukes y Cantor 1969). La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor – Joining (NJ) (Saitou y Nei 1987) usando el programa TREECON (Van de Peer y De Watcher 1994). Para estimar la robustez de los nodos se realizó un análisis de *bootstrap* de 1000 iteraciones. Las curvas de rarefacción de cada gen se construyeron con el programa Clusterer (Klepac-Ceraj y col. 2006).

Adicionalmente, los clones del gen *amoA* de ambos suelos se digirieron *in silico* para confrontar los TRFs esperados con los observados en el análisis de TRFLP utilizando el programa Bioedit versión 7.0.5.2 (Hall 1999). Se registró el tamaño del fragmento terminal producido por la digestión de cada secuencia con las enzimas *HaeIII* y *MspI*.

Las secuencias de los diferentes genes obtenidos se depositaron en la base de datos del GenBank. Los números de acceso para el suelo semiárido del matorral son: EU620169 a EU620195 (16S rDNA), EU620196 a EU620223 (*amoA*), EU645543 a EU645573 (*nirK*) y EU650277 a EU650316 (*nirS*). Para el suelo árido del desierto: EU603370 a EU603398 (rDNA 16S) y EU616583 a EU616610 (*amoA*)

2.5.5. Análisis de restricción del gen rDNA 16S (ARDRA)

Los productos de PCR del gen rDNA 16S se purificaron mediante el Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) y se cuantificaron en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE IX tal como se describió previamente. Cien nanogramos del producto de

PCR se digirieron con 20 U de las enzimas de restricción *HaeIII* y *MspI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en reacciones separadas durante 12 h a 37°C, posteriormente las enzimas se inactivaron a 65°C por 10 min. El producto de la digestión se corrió durante 4 horas a 200 V en electroforesis vertical en geles de acrilamida-bisacrilamida (19:1) al 8% en amortiguador TAE 1X. El tamaño de los fragmentos de digestión se determinó comparando con el estándar de peso molecular 50 bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las bandas se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata usando una modificación del protocolo descrito por Neilan y col. (1994). Brevemente, los geles se fijaron en etanol al 10% durante 5 min, se sumergieron en HNO₃ al 1% durante 5 min, se lavaron tres veces con agua desionizada y se colocaron en una solución de AgNO₃ al 0,2% durante 20 min en oscuridad. Finalmente, los geles se lavaron con agua desionizada durante 1 min y se les añadió una solución de Na₂CO₃ 0,28 M suplementada con formaldehído al 0,5%. Los geles se agitaron hasta la aparición de las bandas. La reacción de tinción se detuvo sumergiéndolos 5 min en ácido acético al 10%.

2.5.6. Resolución por TRFLP del gen *amoA*

Los productos de PCR marcados con fluorescencia se purificaron mediante el Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) y se cuantificaron en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE 1X. Cien nanogramos del producto de PCR se digirieron con 20 U de las enzimas de restricción *HaeIII* y *MspI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en reacciones separadas durante 12 h a 37°C, posteriormente las enzimas se inactivaron a 65°C por 10 min. Una alícuota de cada producto digerido se mezcló con formamida desionizada y un marcador de peso molecular interno (<500 pb). Los fragmentos

de digestión se separaron por electroforesis capilar en un Analizador Genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

2.5.7. Estandarización y análisis de los perfiles de TRFLP

El tamaño en pares de bases de los fragmentos terminales de restricción (TRFs), la altura y el área de los picos en los electroferogramas se determinaron con el programa GeneScan 3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Para el análisis se incluyó sólo aquella fracción del electroferograma comprendida entre los 30 y 500 pb. Se analizaron los TRFs con una fluorescencia asociada de 30 unidades o más ya que se distinguieron claramente de la fluorescencia basal. Para corroborar la reproducibilidad del método de TRFLP se eligieron muestras al azar y se procesaron por duplicado partiendo del mismo extracto de DNA. El análisis de éstas demostró que la diferencia entre ellas no sobrepasa el 5%. Los patrones obtenidos a partir de las diferentes muestras se estandarizaron mediante un procedimiento de normalización iterativo (Dunbar y col. 2001), a partir del cual se determinó la fluorescencia relativa de los TRFs. Adicionalmente los perfiles se alinearon manualmente para evitar la identificación errónea de un TRF. Los fragmentos de diferentes longitudes representan distintas unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y no necesariamente especies bacterianas individuales. Por lo tanto la fluorescencia de cada TRF se utilizó como un indicador de la abundancia relativa de los OTUs identificados en cada muestra. Los datos de las digestiones con dos enzimas de restricción se combinaron para los análisis posteriores (Dunbar y col. 2001).

Para comparar los perfiles de TRFLP se utilizó la abundancia relativa de cada OTU y se calculó la distancia Euclideana (Manly 1994). El dendrograma se construyó aplicando

el algoritmo UPGMA (Li 1981) en el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK). El valor estadístico de los nodos ($P < 0,05$) se determinó por análisis de MonteCarlo con 1000 iteraciones de la matriz en el programa PopTools versión 2.5 (Hood 2000). Además, los datos de porcentajes de fluorescencia relativa de cada TRF se tradujeron a una matriz binaria de presencia-ausencia. En este caso las distancias genéticas se calcularon usando el índice de coincidencia simple (Sneath y Sokal 1973). La topología del dendrograma se infirió mediante análisis de UPGMA con el programa TREECON (Van de Peer y De Watcher 1994). La robustez del agrupamiento se validó mediante análisis de *bootstrap* con 1000 iteraciones.

2.5.8. Relación entre diversidad genética y factores edáficos

El Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) es un método multivariado de análisis directo adecuado para describir la relación entre la diversidad genética (TRFLP) y las variables edáficas (Yang y Crowley 2000; Yannarell y Triplett 2005; Morales y col. 2006; Córdova-Kreylos y col. 2006). Sin embargo, para la aplicación de estos análisis es necesario comprobar que las variables medidas no estén fuertemente correlacionadas. Este fenómeno podría afectar el análisis haciendo los coeficientes de correlación muy inestables (Ter Braak 1990). La posible correlación entre los factores ambientales analizados se evaluó mediante el coeficiente de Pearson según el modelo de regresión lineal usando el programa GraphPad Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Posteriormente se realizó el CCA donde se relacionaron los perfiles de TRFLP, considerando la abundancia relativa de cada TRF, con los parámetros edáficos correspondientes a los suelos de cada tipo y tratamiento. Las variables edáficas fueron: contenido hídrico (CH), materia orgánica (MO),

pH, potencial de óxido-reducción (ORP), contenido de nitrato (NO_3^-) y contenido de amonio (NH_4^+). El CCA se realizó en el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK). 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. El modelo completo incluyó las variables ambientales como parte del mismo y disminuye la probabilidad de cometer error Tipo II. Por el contrario, el modelo reducido excluye las variables a probar del modelo y permite el mantenimiento de error Tipo I en muestras pequeñas (Ter Braak y Smilauer 1988).

2.6. DIVERSIDAD METABÓLICA

2.6.1. Perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP)

Para estudiar la diversidad fisiológica de las comunidades bacterianas se usaron las placas Biolog EcoPlateTM (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) (Garland 1997). Estas placas, están diseñadas para caracterizar las comunidades microbianas en función de la utilización de 31 fuentes de carbono. Para inocular las placas se tomó el equivalente a 1 g de PS de suelo de cada muestra, se resuspendió en 9 ml de PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4) y se agitó toda la noche. La solución de suelo se hizo pasar por un papel de filtro (8 μm de poro) y 100 μl de la misma se inocularon en cada pocillo. Las placas se incubaron durante 192 h a 25°C en una cámara húmeda. La aparición de color en

los pocillos individuales se registró cada 24 h a lo largo de todo el experimento midiendo la densidad óptica (OD) a 490 nm utilizando un lector de ELISA.

2.6.2. Estimación de la diversidad metabólica de la comunidad

A partir de los perfiles fisiológicos comunitarios (CLPP) se calcularon dos parámetros para describir la diversidad metabólica de la comunidad microbiana: i) el promedio de la respuesta metabólica (AMR) que describe la respiración promedio de las fuentes de carbono de la comunidad microbiana y que se calcula como el promedio de las diferencias medias entre la OD de los pocillos conteniendo fuentes de carbono y el pocillo control; y ii) la diversidad metabólica de cada muestra (CMD) que representa el número de sustratos utilizados por la comunidad microbiana y es análogo a la riqueza metabólica de la comunidad. La CMD se calcula sumando el número de respuestas positivas (pocillos de color púrpura) observadas durante la incubación. El umbral de OD por encima de la cual la coloración púrpura indica un uso de la fuente de carbono por la comunidad microbiana se estableció en 0,25 (Garland 1997). Cada uno de estos parámetros se graficaron contra el tiempo de incubación para obtener una cinética metabólica de la comunidad microbiana.

A partir de los datos de OD de cada pocillo se estimó la diversidad metabólica bacteriana asociada con los diferentes tipos de suelo y tratamiento. Para ello se calculó el índice de Shannon (H') según la fórmula $H = -\sum p_i \ln p_i$ (Begon y col. 1990) donde p_i significa la proporción del uso de cada fuente de carbono, respecto al total de las fuentes de carbono usadas como sustrato. Así también, se determinó el índice de equitatividad (J) usando la fórmula $J = H/H_{\text{máx}}$ (Begon y col. 1990) donde: $H_{\text{máx}} = \ln S$, siendo S el

número promedio total de fuentes de carbono que cada comunidad fue capaz de utilizar. Los cálculos se realizaron con el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK).

Adicionalmente, con los datos de OD de la lectura en cada pocillo se construyó una matriz para comparar las muestras. Para ello se calculó la distancia Euclideana (Manly 1994) considerando los valores de OD de cada pocillo. El dendrograma se construyó aplicando el algoritmo UPGMA (Li 1981) en el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, UK). El valor estadístico de los nodos ($P < 0,05$) se determinó por análisis de MonteCarlo con 1000 iteraciones de la matriz en el programa PopTools versión 2.5 (Hood 2000). Además, los datos de OD de cada pocillo se tradujeron a una matriz binaria de presencia-ausencia. En este caso las distancias genéticas se calcularon usando el índice de coincidencia simple (Sneath y Sokal 1973). La topología del dendrograma se infirió mediante análisis de UPGMA con el programa TREECON (Van de Peer y De Watcher 1994). La robustez del agrupamiento se validó mediante análisis de *bootstrap* con 1000 iteraciones.

2.6.3. Relación entre diversidad metabólica y factores edáficos

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

RESULTADOS

3.1. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA TOTAL, DE LAS BACTERIAS NITRIFICADORAS Y DE LAS BACTERIAS DESNITRIFICADORAS EN EL SUELO SEMIÁRIDO DEL MATORRAL Y EL SUELO ÁRIDO DEL DESIERTO

3.1.1. Composición de la comunidad bacteriana total

Para obtener una aproximación experimental de la composición de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de suelo árido y semiárido, se construyeron dos genotecas de amplicones del gen rDNA 16S, una para cada tipo de suelo, y se identificaron los clones mediante secuenciación. Los clones secuenciados se relacionaron con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (Tabla A1, Anexos).

Un 78% y 76% de las secuencias obtenidas para el suelo semiárido y árido respectivamente, presentaron la identidad más alta con clones procedentes de muestras ambientales, es decir cepas que no han sido aisladas y cultivadas. Sólo el 22% y 24% restantes correspondieron a bacterias cultivadas e identificadas. La mayoría de los clones presentaron la identidad de secuencia más alta con clones o cepas obtenidos a partir de muestras de suelo de diferentes orígenes, con porcentajes de identidad mayores en el suelo semiárido que en el árido (89% y 69%, respectivamente) (Tabla A1, Anexos).

El suelo árido del desierto mostró mayor riqueza de filotipos que el suelo del matorral semiárido (Figuras 6 y 7). En el suelo semiárido del matorral esclerófilo, Acidobacteria fue el *phylum* dominante (29,6% de los clones), mientras que en el suelo

árido del desierto este grupo representó sólo un 3,5% de los clones. En cambio, en el suelo árido dominó Firmicutes (41,4% de los clones), grupo que estuvo sólo representado por un 3,7% de los clones del suelo semiárido. Los firmicutes del suelo árido del desierto, cuando se pudieron clasificar a nivel de clase, estuvieron relacionados a Bacilli (Figuras 6 y 7).

Las actinobacterias estuvieron igualmente representadas en ambas genotecas (18,5% y 17,2% de los clones de suelo semiárido y árido, respectivamente). En el suelo semiárido los clones pertenecientes a la clase Actinobacteria se asociaron a los órdenes Rubrobacterales y Actinomycetales. Dentro del orden Actinomycetales, los clones se relacionaron a los subórdenes Micromonosporineae y Frankineae. En el suelo árido los clones relacionados con Actinobacterias se asociaron a secuencias del orden Actinomycetales, y a los subórdenes Micrococcineae y Corynebacterineae (Figuras 6 y 7).

En el caso de los clones asociados a los bacteroidetes, estuvieron representados en el suelo semiárido por un 18,5%; en cambio en el suelo árido sólo alcanzaron un 6,9%, uniéndose en ambos suelos a secuencias de la clase Sphingobacteria. Por el contrario, el *phylum* Gemmatimonadetes fue más abundante en el suelo árido (10,3%) que en el semiárido (3,7%) (Figuras 6 y 7).

El grupo de las proteobacterias constituyó un 18,5% de los clones del suelo semiárido y un 10,34% de los clones del suelo árido. En el suelo semiárido sólo se encontraron representantes de la clase Alphaproteobacteria, ausente en el suelo árido. Dentro de la clase Alphaproteobacteria, los clones del suelo semiárido se asociaron a secuencias de los órdenes Rhodobacterales y Rhizobiales. Por el contrario, en el suelo árido se encontraron clones asociados a Beta-, Delta- y Gammaproteobacteria (Figuras 6 y 7).

Finalmente, Verrucomicrobia se encontró sólo en el suelo semiárido, mientras que Nitrospirae, Chloroflexi y Planctomycetes sólo se encontraron en el suelo árido. Sin embargo, cada uno de estos grupos estuvo escasamente representado en cada tipo de suelo (Figuras 6 y 7).

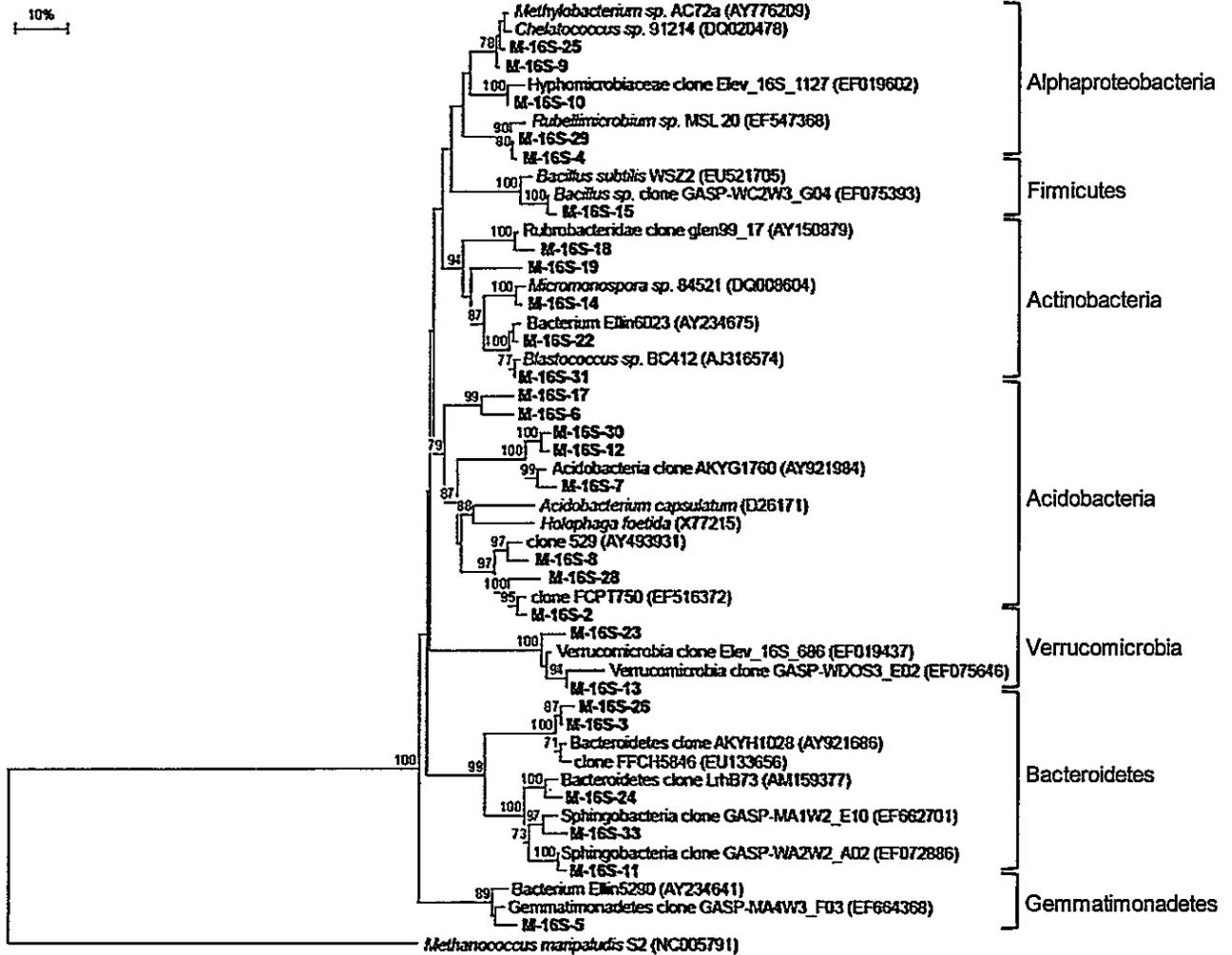


Figura 6. Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen rDNA 16S (en negrita) del suelo semiárido (M: matorral). Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalW (Bioedit, versión 7.0.5.2). Se usó el índice de Jukes y Cantor para calcular las distancias genéticas. La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor-Joining con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Se incluyeron secuencias publicadas en el GenBank relacionadas a los clones obtenidos, junto a cada secuencia se indica el número de acceso. El gen rDNA 16S de *Methanococcus maripaludis* S2 (NC005791) se utilizó para enraizar el árbol. Se muestran los valores de *bootstrap* sobre 70.

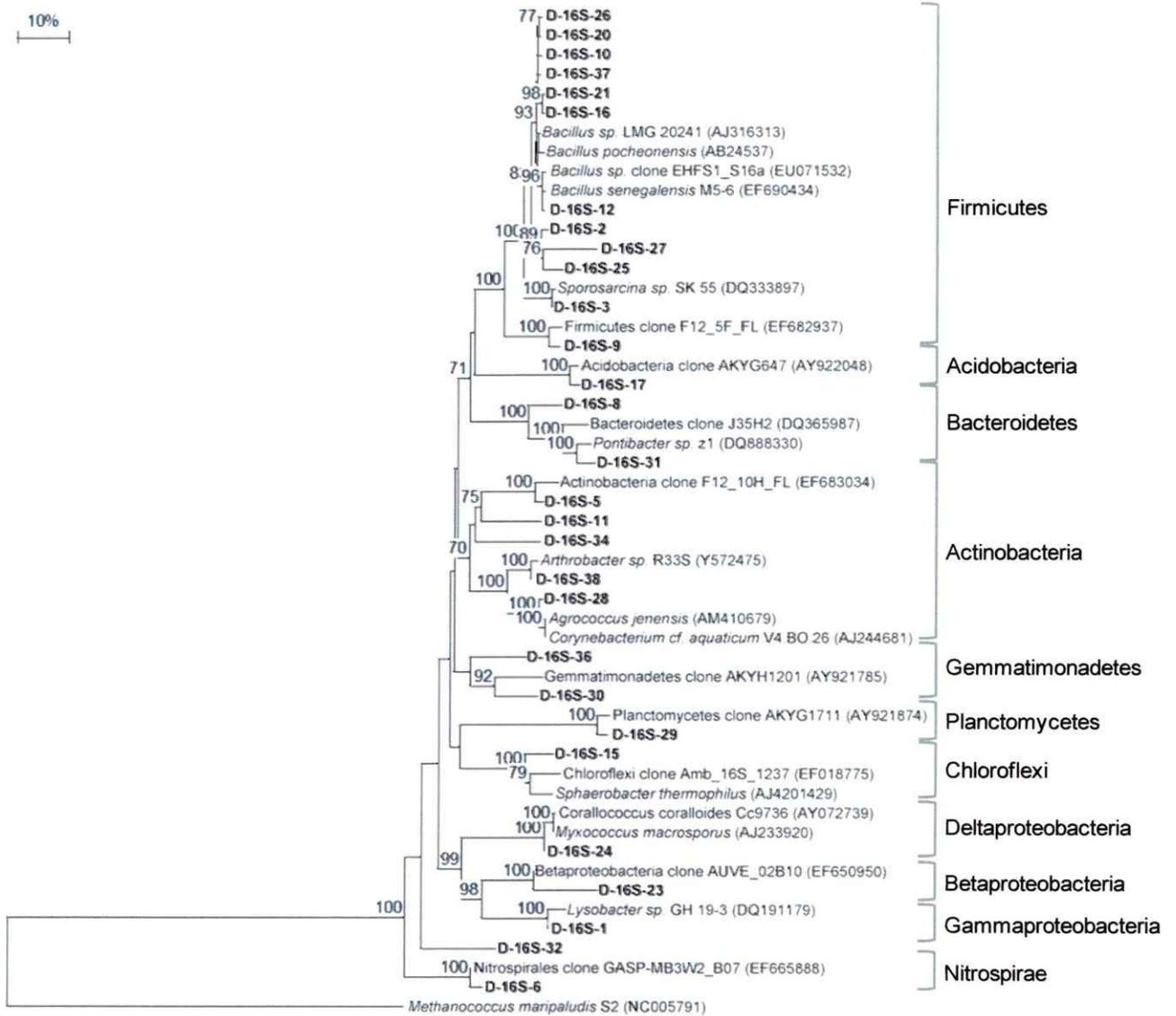


Figura 7. Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen rDNA 16S (en negrita) del suelo árido (D: desierto). Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalW (Bioedit, versión 7.0.5.2). Se usó el índice de Jukes y Cantor para calcular las distancias genéticas. La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor-Joining con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Se incluyeron secuencias publicadas en el GenBank relacionadas a los clones obtenidos, junto a cada secuencia se indica el número de acceso. El gen rDNA 16S de *Methanococcus maripaludis* S2 (NC005791) se utilizó para enraizar el árbol. Se muestran los valores de *bootstrap* sobre 70.

3.1.2. Composición de las bacterias nitrificadoras

La composición de los nitrificadores fue determinada por clonación y secuenciación del gen *amoA*, el cual codifica para la subunidad α de la enzima amonio monooxigenasa. Tanto en el suelo árido como en el semiárido, todos los clones obtenidos se asociaron a secuencias del género *Nitrospira* (Figuras 8 y 9). En ningún caso los clones secuenciados se relacionaron con el género *Nitrosomonas*, por lo que *N. europaea* se usó como grupo externo en los análisis. Los clones de ambos suelos se unieron a especies del grupo 3 del género *Nitrospira* según la clasificación de los oxidadores de amonio basada en el rDNA 16S (Stephen y col. 1996), aunque en general no se unieron a las mismas secuencias.

En el suelo semiárido del matorral un 39,3% de los clones se unieron a los clones ambientales 3-14 (AY667589) y *Nitrospira* sp. Nt1 (AY445617) y un 25% al clon ambiental 20-7 (AY667602). Ninguno de los clones del suelo árido del desierto se relacionó con estos clones ambientales. Además, un 17,9% de los clones del suelo semiárido se relacionaron al clon ambiental QY-A30 (EF207206), el cual se agrupó junto a un *cluster* formado por *Nitrospira briensis* y dos de los clones obtenidos en este trabajo. Por último, uno de los clones del suelo semiárido se relacionó directamente con *Nitrospira briensis*.

En el suelo árido del desierto el grupo de clones más abundante (28,6%) no se unió a ninguna secuencia reportada en la base de datos. Un 21,4% de los clones obtenidos de este suelo se unieron al clon ambiental QY-A5 (EF207181), ninguno de los obtenidos para el suelo semiárido se relacionó con este clon. Asimismo, 25% de los clones del suelo árido estuvieron agrupados junto a los clones ambientales A25 (EF122020), A33 (EF122028) y FQ-A5 (EU137853) los cuales no se relacionaron con clones obtenidos del suelo semiárido.

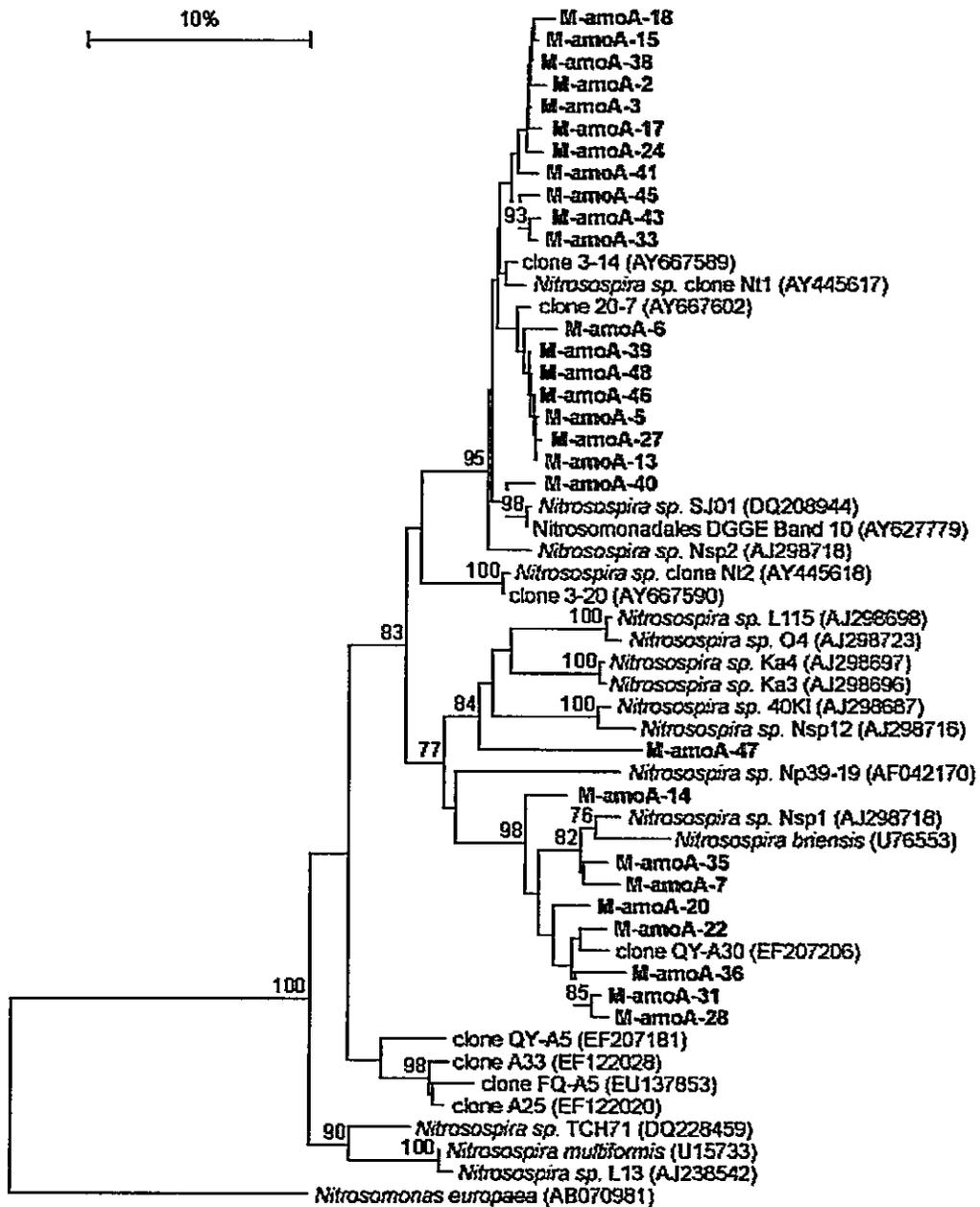


Figura 8. Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen *amoA* (en negrita) del suelo semiárido (M: matorral). Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalW (Bioedit, versión 7.0.5.2). Se usó el índice de Jukes y Cantor para calcular las distancias genéticas. La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor-Joining con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Se incluyeron secuencias publicadas en el GenBank relacionadas a los clones obtenidos, junto a cada secuencia se indica el número de acceso. El gen *amoA* de *Nitrosomonas europaea* (AB070981) se utilizó para enraizar el árbol. Se muestran los valores de *bootstrap* sobre 70.



Figura 9. Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen *amoA* (en negrita) del suelo árido (D: desierto). Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalW (Bioedit, versión 7.0.5.2). Se usó el índice de Jukes y Cantor para calcular las distancias genéticas. La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor-Joining con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Se incluyeron secuencias publicadas en el GenBank relacionadas a los clones obtenidos, junto a cada secuencia se indica el número de acceso. El gen *amoA* de *Nitrosomonas europaea* (AB070981) se utilizó para enraizar el árbol. Se muestran los valores de *bootstrap* sobre 70.

3.1.3. Composición de las bacterias desnitrificadoras

La oxidación de nitrito a óxido nítrico distingue a los desnitrificadores de las demás bacterias que respiran nitrato. Esta reacción es central en la desnitrificación y es catalizada por dos tipos diferentes de nitrito reductasas codificadas por los genes *nirK* y *nirS*. En el suelo árido no se detectó la presencia de genes de desnitrificadores con la metodología utilizada, lo cual sugiere una reducida abundancia de este grupo.

La secuenciación y análisis filogenético de los clones del gen *nirK* del suelo semiárido revelaron que la mayor parte de las secuencias se relacionaron con clones de desnitrificadores aún no cultivados obtenidos de diferentes tipos de suelos. La bacteria desnitrificadora cultivada más cercana a los clones de este estudio es *Blastobacter denitrificans*. Tres clones, M-nirK-59, M-nirK-19 y M-nirK-38, se ubicaron distantes del resto de los clones. Además, dos de estos clones estuvieron cercanos al cluster formado por *Alcaligenes faecalis* y *Ochrobactrum anthropi*. Sin embargo, ningún clon obtenido se relacionó directamente con microorganismos identificados. Asimismo, se destaca un cluster formado exclusivamente por clones de este trabajo (Figura 10).

Los clones del gen *nirS* del suelo semiárido aparecieron más distribuidos en el árbol filogenético. A diferencia de los clones del gen *nirK*, algunas secuencias del gen *nirS*, se encontraron asociadas cercanamente con microorganismos identificados. El clon M-nirS-28 se relacionó con *Pseudomonas chloritidismutans* y el clon M-nirS-1 con *Azoarcus* sp. EbN1. Además, se observaron tres grupos de clones que aparecieron más relacionados con *Dechloromonas* sp. R-28400, con *Alcaligenes eutrophus* H16 y con *Roseobacter denitrificans* ATCC33942T (Figura 11).

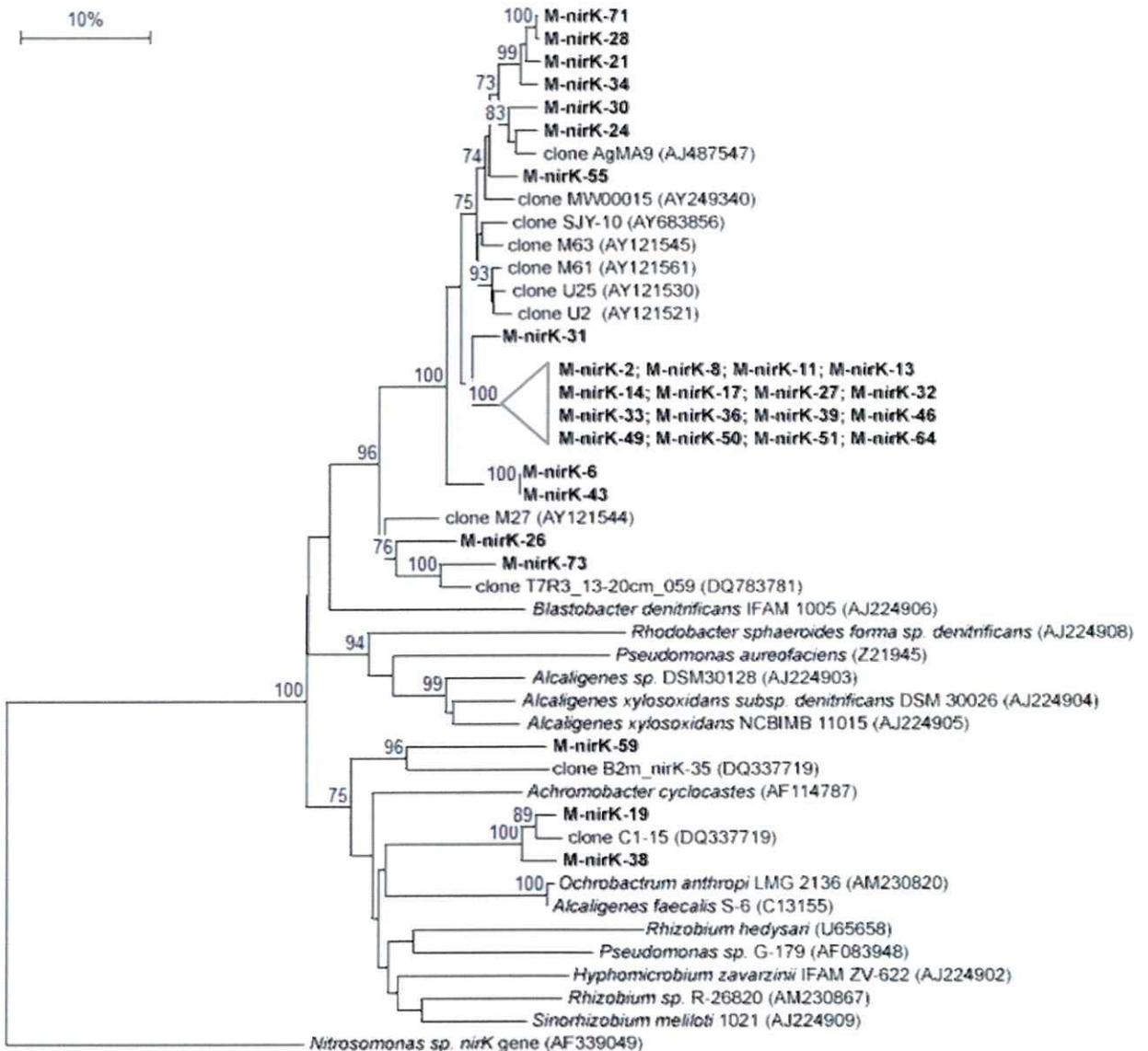


Figura 10. Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen *nirK* (en negrita) del suelo semiárido (M: matorral). Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalW (Bioedit, versión 7.0.5.2). Se usó el índice de Jukes y Cantor para calcular las distancias genéticas. La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor-Joining con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Se incluyeron secuencias publicadas en el GenBank relacionadas a los clones obtenidos, junto a cada secuencia se indica el número de acceso. El gen *nirK* de *Nitrosomonas sp.* (AF339049) se utilizó para enraizar el árbol. Se muestran los valores de *bootstrap* sobre 70.

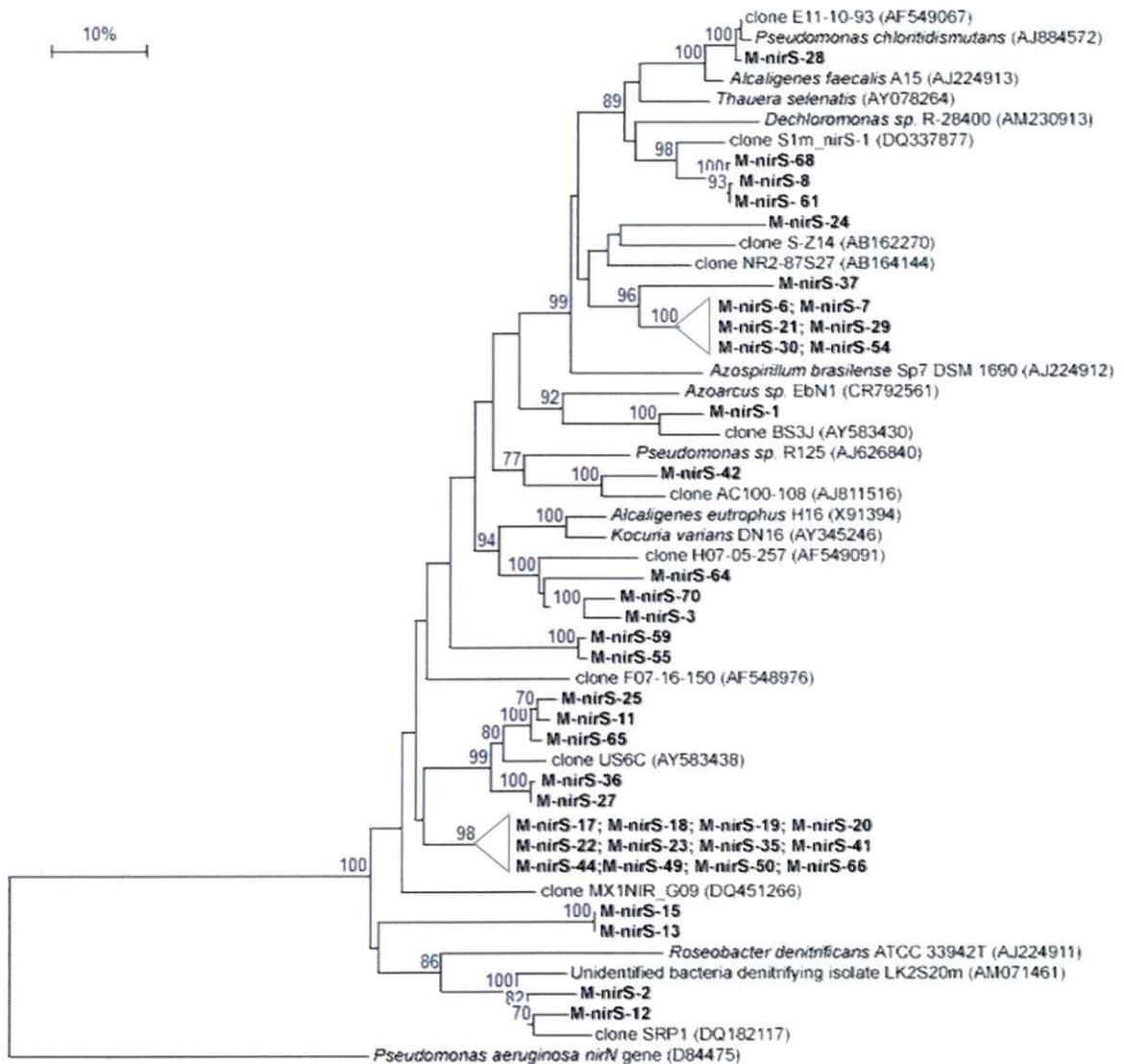


Figura 11. Árbol filogenético basado en las secuencias de los clones del gen *nirS* (en negrita) del suelo semiárido (M: matorral). Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalW (Bioedit, versión 7.0.5.2). Se usó el índice de Jukes y Cantor para calcular las distancias genéticas. La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor-Joining con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Se incluyeron secuencias publicadas en el GenBank relacionadas a los clones obtenidos, junto a cada secuencia se indica el número de acceso. El gen *nirN* de *Pseudomonas aeruginosa* (D84475) se utilizó para enraizar el árbol. Se muestran los valores de *bootstrap* sobre 70.

3.1.4. Curvas de rarefacción

Para analizar la riqueza de cada uno de los grupos estudiados en los dos tipos de suelo, se trazaron curvas de rarefacción basadas en el número de secuencias obtenidas (Figura 12). La linealidad de las curvas de rarefacción del gen rDNA 16S de ambos tipos de suelo indican que el número de secuencias obtenidas no es suficiente para representar el número de secuencias presentes en estos suelos. El número de *clusters* formados por los nitrificadores en el suelo semiárido fue menor que en el suelo árido, a pesar de que el esfuerzo de muestreo fue el mismo. Finalmente, el suelo semiárido presentó una mayor diversidad genética para el gen *nirS* que para el *nirK*. La curva para el gen *nirK* muestra una tendencia curvilínea, lo que indica que el análisis realizado abarcó la mayoría de la diversidad de este gen. Sin embargo, la curva para el gen *nirS* muestra una tendencia curvilínea débil, indicando que su riqueza fue subestimada en este ambiente, a pesar de que el esfuerzo de muestreo fue mayor. No obstante, los clones obtenidos en las distintas genotecas representarían las secuencias más abundantes en estos tipos de suelos.

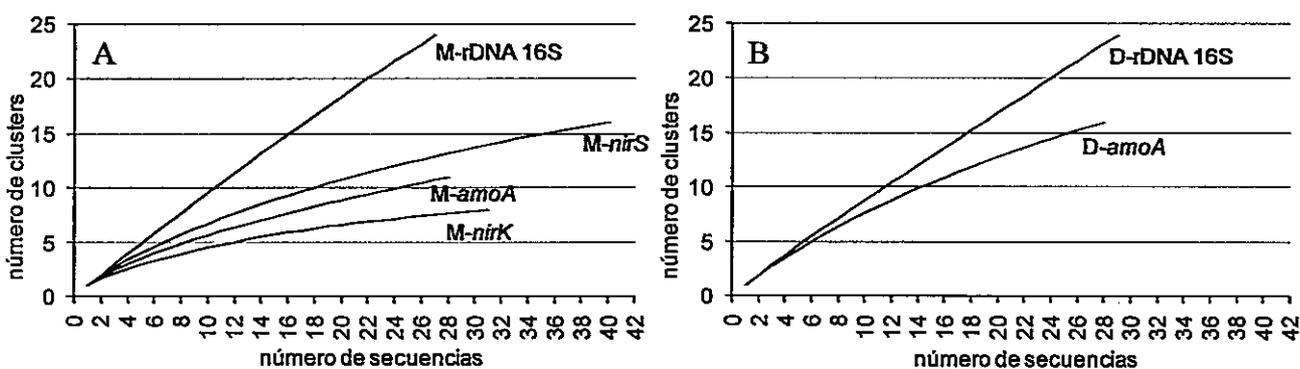


Figura 12. Curvas de rarefacción A: para los genes rDNA 16S, *amoA*, *nirK* y *nirS* del suelo semiárido (M: matorral); y B: para los genes rDNA 16S y *amoA* del suelo árido (D: desierto).

3.2. DISEÑO DE LOS MICROCOSMOS

Para estudiar el efecto de la precipitación ácida de Nr se diseñaron microcosmos con suelo semiárido del matorral esclerófilo de Chile central y con suelo árido del desierto de Atacama. Para evaluar el efecto de esta perturbación sobre los parámetros edáficos y la microbiota bacteriana del suelo se aplicó un tratamiento combinado de nitrógeno y ácido adicionando una solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) al inicio de la incubación de los microcosmos. Para separar los efectos del pH y el nitrógeno se realizaron los siguientes tratamientos, todos ellos al 60% de la capacidad de retención de agua: i) adición de agua desionizada; ii) adición de una solución ácida (pH 4,0) sin nitrato de amonio; iii) adición de una solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); iv) adición de solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). La incubación se realizó durante 84 días a 25°C .

Inicialmente se probaron dos sistemas diferentes, botellas de vidrio de 20 ml con tapa a rosca y cajas plásticas de 250 ml. Las mediciones de materia orgánica (MO), pH, potencial de óxido-reducción (ORP) y los contenidos de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) indicaron que no hubo diferencias significativas entre los dos tipos de recipientes. Sin embargo, se seleccionó el diseño de cajas únicas para todas las determinaciones de un tratamiento, lo cual reduciría la variabilidad en las determinaciones debidas a muestras independientes. Con el diseño de botellas, las muestras en los distintos tiempos de incubación de un microcosmos son independientes. Si bien este diseño podría minimizar la perturbación de los microcosmos en cada muestreo, podría teóricamente aumentar la variabilidad entre los diferentes muestreos.

3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PRECIPITACIÓN ÁCIDA DE NITRÓGENO REACTIVO SOBRE LOS PARÁMETROS EDÁFICOS Y LAS ACTIVIDADES MICROBIANAS

3.3.1. Factores edáficos

La relación C/N y los contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio disponibles fueron medidos cada 28 días para cada tratamiento durante el tiempo de incubación de los microcosmos de ambos tipos de suelo (Tabla A2, Anexos). Los nutrientes disponibles mostraron poca variación durante el tiempo, lo que garantiza que ninguno de ellos fue limitante durante la incubación. Sólo se observaron diferencias en el contenido de nitrógeno en los tratamientos en los cuales fue adicionado Nr. La relación C/N fue similar en ambos tipos de suelo mientras que los contenidos de nitrógeno y fósforo fueron mayores en el suelo semiárido. Por el contrario, los niveles de potasio fueron mayores en el suelo árido.

En la Figura 13 se muestran las variaciones de los parámetros edáficos medidos semanalmente para cada tratamiento durante el tiempo de incubación de los microcosmos de ambos tipos de suelo. El porcentaje de materia orgánica (MO), para ambos tipos de suelo, no presentó variaciones en cuanto al tratamiento aplicado. Sin embargo, se observaron algunas fluctuaciones en el tiempo de incubación que en ambos casos fueron de $\pm 20\%$. El suelo semiárido presentó un contenido de MO 10 veces mayor que el suelo árido.

Durante la incubación de los microcosmos el contenido hídrico (CH) disminuyó rápidamente en el suelo árido y más lentamente en el suelo semiárido, alcanzando a los 7 días la humedad que presentaban los suelos antes de la aplicación de los tratamientos. Consistente con la disminución en el CH, el potencial de óxido-reducción (ORP) aumentó durante la incubación, e indicó condiciones aeróbicas durante todo el ensayo (Figura 13).

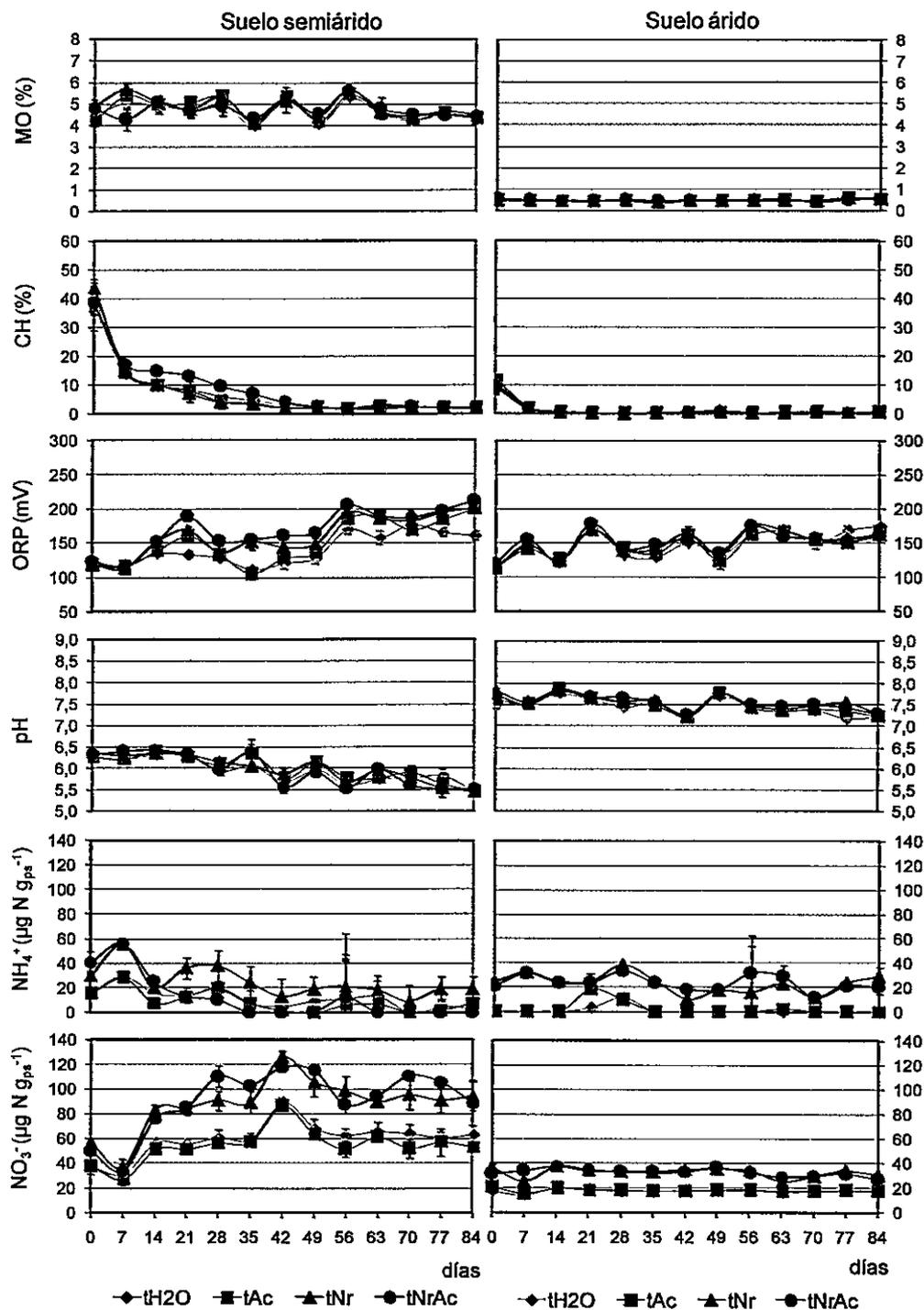


Figura 13. Parámetros edáficos determinados durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral) y árido (desierto), con los distintos tratamientos aplicados. Valores promedio \pm EE. pH; potencial de óxido reducción (ORP); Contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH_4^+); contenido de nitrato (NO_3^-). Tratamientos: tH2O: agua desionizada (rombo); tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr (cuadrado); tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) (triángulo); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) (círculo).

El pH disminuyó levemente en el suelo árido hacia el final de la incubación, mientras que en el suelo semiárido la disminución fue de mayor magnitud. Al menos para el suelo semiárido, esta disminución puede ser el resultado del incremento que se observó en el contenido de nitrato (NO_3^-), lo que sugiere una posible actividad de nitrificación en los primeros 42 días, siendo este efecto mayor para los tratamientos conteniendo Nr (Figura 13).

Más aun, se observó un aumento en el contenido de amonio (NH_4^+) al inicio de la incubación, con una tendencia subsecuente a disminuir que se mantuvo durante el resto de la incubación. Sin embargo, en el suelo árido ni el contenido de nitrato ni el contenido de amonio presentaron cambios durante la incubación, aunque los contenidos fueron mayores en los tratamientos con Nr (Figura 13).

De acuerdo al ANOVA de dos vías (Tabla A3, Anexos), no se observaron diferencias significativas del pH, ORP, CH y MO entre los tratamientos. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de incubación, en ambos tipos de suelo, para todos los parámetros edáficos medidos. El factor tiempo dio cuenta de la mayor parte de la varianza total contenida en los datos de pH (77,82% y 79,35% para suelo semiárido y árido, respectivamente), ORP (74,33% y 83,85%), CH (92,51% y 88,75%) y MO (46,49% y 36,46%). Con respecto a los contenidos de NO_3^- y NH_4^+ , la varianza fue estadísticamente explicada por el factor tratamiento en el caso del suelo árido (62,55% y 85,84%, respectivamente). En cambio, en los microcosmos de suelo semiárido, la varianza en el contenido de NH_4^+ fue explicada por el factor tiempo de incubación (39,52%) y en el caso de NO_3^- tanto el factor tiempo (43,82%) como el factor tratamiento (38,40%) dieron cuenta de la varianza observada (Tabla A3, Anexos).

Al analizar las correlaciones de los parámetros edáficos medidos (Tabla 2), se observa que hubo una correlación estadísticamente significativa entre el CH y el ORP para ambos tipos de suelo en todos los tratamientos ($r = -0,41$; $P = 0,0093$ a $r = -0,69$; $P < 0,0001$ para suelo semiárido y $r = -0,47$; $P = 0,0024$ a $r = -0,51$; $P = 0,0008$ para suelo árido) así la pérdida de agua estuvo relacionada con un aumento del potencial redox (Tabla 2).

Además, en los microcosmos de suelo semiárido, se observó correlación significativa entre la disminución del pH y el CH ($r = 0,44$; $P = 0,0054$ a $r = 0,61$; $P < 0,0001$). Asimismo, el aumento en el contenido de NO_3^- se correlacionó significativamente con esta disminución ($r = -0,38$; $P = 0,0167$ a $r = -0,55$; $P = 0,0003$ y $r = -0,52$; $P = 0,0008$ a $r = -0,68$; $P < 0,0001$ para pH y CH, respectivamente) (Tabla 2). Además, en el microcosmos de suelo semiárido, se observó que el incremento en la producción de NO_3^- apareció correlacionado con una disminución en el contenido de NH_4^+ ($r = -0,41$; $P = 0,0098$ a $r = -0,85$; $P < 0,0001$) (Tabla 2).

Dado que el contenido de NO_3^- fue el que presentó las mayores variaciones durante la incubación de los microcosmos, los valores obtenidos con técnicas colorimétricas se corroboraron por cromatografía iónica. En la Figura 14 se muestra la variación del contenido de nitrato durante la incubación, determinado por ambas técnicas. Los datos muestran un mayor contenido de nitrato en los microcosmos tratados con Nr, durante todo el período de incubación. También se observó un aumento de nitrato en las primeras semanas de los microcosmos, posiblemente debido a actividad de nitrificación, la cual fue mayor en presencia de Nr.

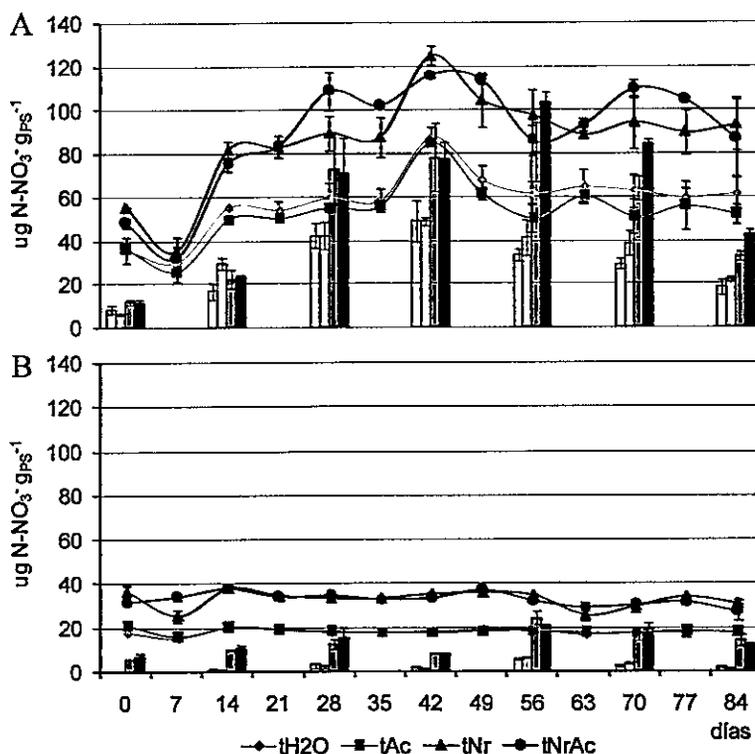


Figura 14. Contenido de nitrato (NO_3^-) para cada tratamiento durante el tiempo de incubación de los microcosmos de A. suelo semiárido (matorral) y B. árido (desierto). Las líneas representan mediciones colorimétricas y las barras mediciones cromatográficas. Valores promedio \pm EE. Tratamientos: tH₂O: agua desionizada (rombo, primera barra); tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr (cuadrado, segunda barra); tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) (triángulo, tercera barra); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) (círculo, cuarta barra).

El contenido de nitrito (NO_2^-), durante toda la incubación, fue muy cercano a cero, o indetectable con la metodología utilizada (datos no mostrados). Esto concuerda con las rápidas transformaciones que este compuesto sufre en el suelo.

3.3.2. Actividades microbianas

Las tasas de amonificación, nitrificación y desnitrificación se estimaron cada 28 días, para los microcosmos de ambos tipos de suelo y para cada tratamiento. Durante los primeros 28 días de incubación, se observó producción de amonio en todos microcosmos de suelo

semiárido siendo mayor la producción en aquellos microcosmos tratados con Nr, este aumento probablemente fue debido a amonificación desde la materia orgánica en el suelo semiárido. En el caso de los suelos áridos la producción de amonio se detectó sólo en aquellos microcosmos tratados con Nr (Figura 15).

Para ambos suelos se observó un consumo de nitrato durante el primer periodo de incubación (28 días), en parte explicado por la actividad de desnitrificación observada en el mismo período, la cual fue mayor en los microcosmos tratados con Nr. No se observó efecto del tratamiento ácido sobre esta actividad (Figura 15). Posteriormente se observó una pérdida de la actividad desnitrificante con el tiempo de incubación de los microcosmos. Por otro lado, los microcosmos presentaron actividad nitrificante a los 28 días de incubación (Figura 15), siendo mayor en el caso del suelo semiárido (Figura 14).

Estas actividades microbianas, de acuerdo a un ANOVA de dos-vías, presentaron diferencias significativas en el tiempo ($P < 0,0001$). Así el factor tiempo explicó más del 60% de la varianza total en el suelo semiárido (64,99%; 72,14% y 62,33% para amonificación, nitrificación y desnitrificación, respectivamente). En los microcosmos de suelo árido, el efecto del tiempo fue estadísticamente significativo ($P \leq 0,0002$) para explicar la varianza observada (53,89%; 25,50% y 25,68% para amonificación, nitrificación y desnitrificación, respectivamente). Sin embargo, debido a que la interacción "tratamiento x tiempo" también contribuyó a explicar significativamente un porcentaje importante de la varianza (37,08%; 37,65% y 52,50% para amonificación, nitrificación y desnitrificación, respectivamente), los valores de P para los factores tiempo de incubación y tratamientos por separado son difíciles de interpretar (Tabla A3, Anexos).

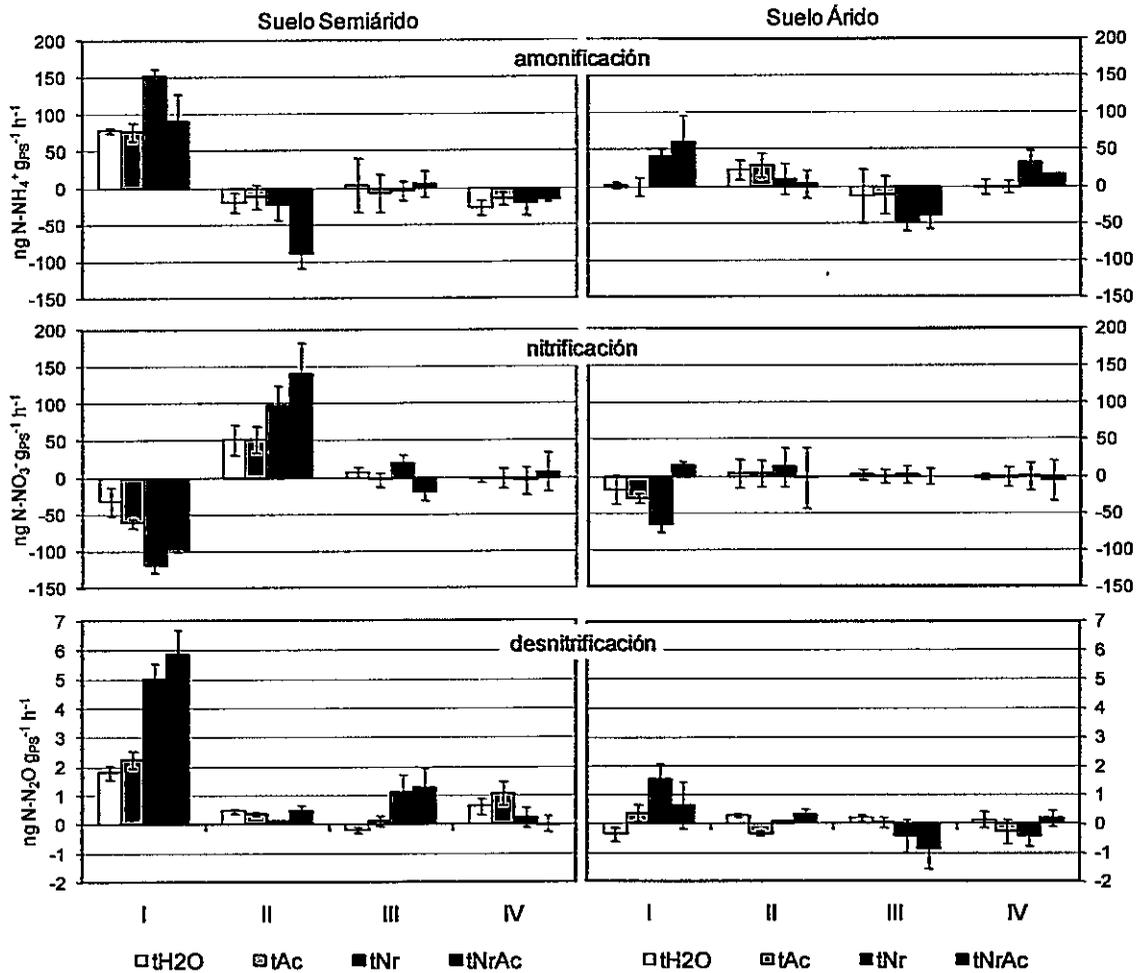


Figura 15. Tasas de amonificación, nitrificación y desnitrificación durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral) y árido (desierto). Valores promedio \pm EE. Tratamientos: tH₂O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Periodos: I: 0-7 días; II: 7-28 días; III: 28-56 días; IV: 56-84 días.

El aumento en la producción de nitrato estuvo fuertemente correlacionada con la disminución del CH ($r = -0,52$; $P = 0,0859$ a $r = -0,80$; $P = 0,0017$ y $r = -0,87$; $P = 0,0003$ a $r = -0,93$; $P < 0,0001$ para suelo semiárido y árido, respectivamente). Además, la pérdida de las actividades de amonificación y desnitrificación durante la incubación de los microcosmos, concomitante con la pérdida de agua, sugiere un efecto importante del CH del suelo sobre estas actividades microbianas. Este efecto fue más notable en el suelo semiárido donde la pérdida de agua fue más lenta ($r = 0,56$; $P = 0,0589$ a $r = 0,89$; $P < 0,0001$ y $r = 0,72$; $P = 0,0089$ a $r = 0,93$; $P < 0,0001$ para amonificación y desnitrificación, respectivamente). En el caso del suelo árido la desnitrificación fue la actividad más correlacionada con la pérdida de agua ($r = 0,53$; $P = 0,0777$ a $r = 0,91$; $P < 0,0001$). Para confirmar esta observación, se rehidrataron muestras del último submuestreo (84 días) con agua desionizada hasta alcanzar nuevamente el 60% de la capacidad de retención de cada uno de los suelos. De esta manera se logró recuperar la actividad de desnitrificación inicial obtenida para el tratamiento con agua desionizada (Figura 16).

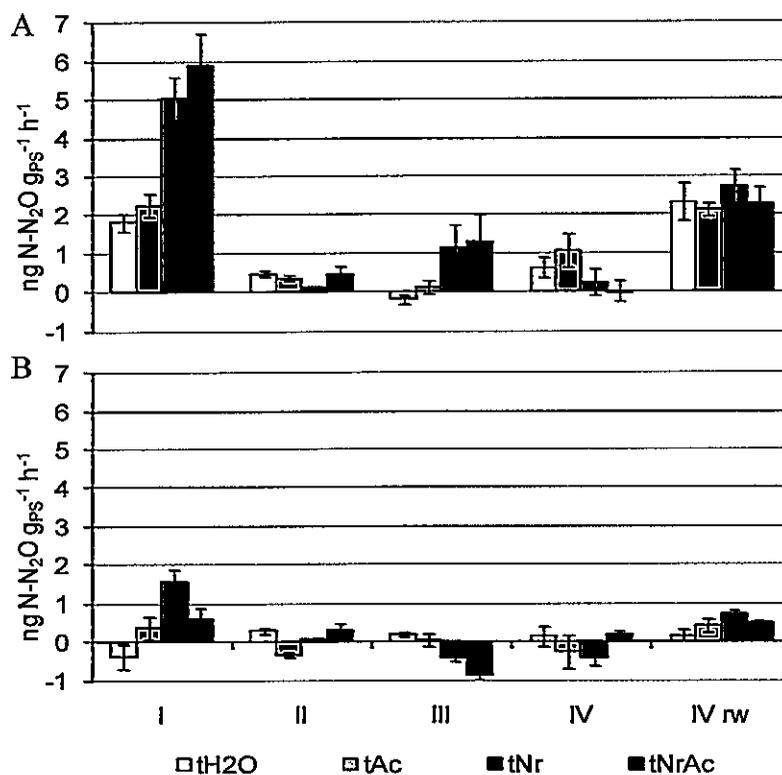


Figura 16. Recuperación de la actividad potencial de desnitrificación inicial por rehidratación de las muestras al final de la incubación de los microcosmos de suelo A. semiárido (matorral) y B. árido (desierto). Valores promedio \pm EE. Tratamientos: tH₂O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Períodos: I: 0-7 días; II: 7-28 días; III: 28-56 días; IV: 56-84 días. IV rw: rehidratación a los 84 días.

3.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PRECIPITACIÓN ÁCIDA DE NITRÓGENO REACTIVO SOBRE LA DIVERSIDAD GENÉTICA BACTERIANA

Para evaluar la influencia de los diferentes tratamientos sobre la diversidad genética de la comunidad bacteriana total y de las bacterias nitrificadoras se utilizaron marcadores moleculares adecuados para cada grupo. La resolución de los amplicones del gen rDNA 16S se realizó por ARDRA y la de los amplicones del gen *amoA* mediante TRFLP.

La Figura 17 muestra que los patrones de ARDRA, obtenidos con la enzima *HaeIII* permanecieron invariables durante todo el ensayo indicando que los tratamientos y el tiempo de incubación no afectaron la diversidad genética de la comunidad total en ambos tipos de suelo. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos con la enzima *MspI* (datos no mostrados).

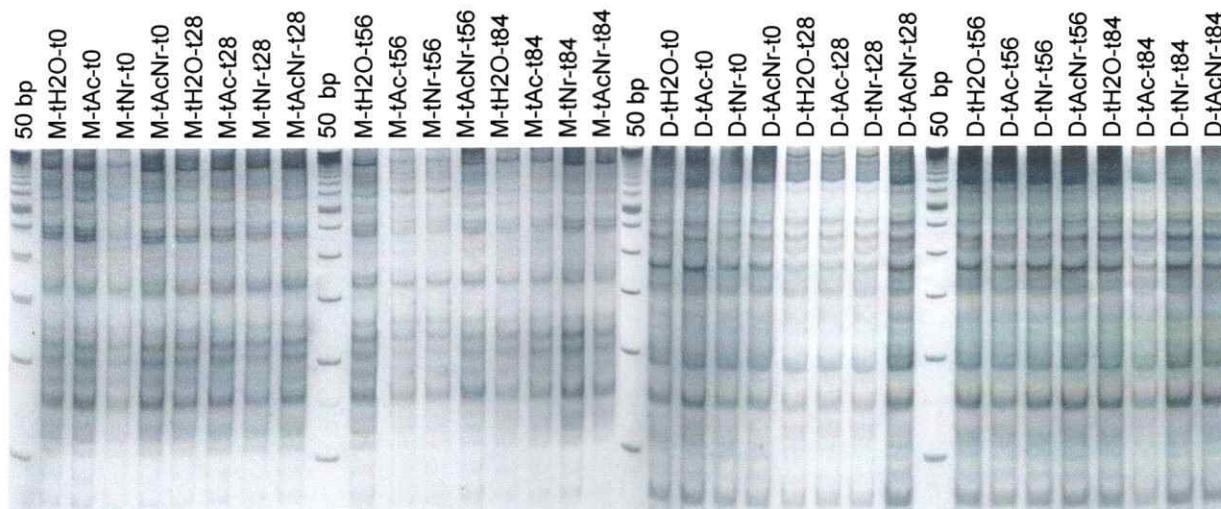


Figura 17. Diversidad genética de la comunidad bacteriana total determinada mediante ARDRA con la enzima *HaeIII* durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (M: matorral) y árido (D: desierto). Tratamientos: tH2O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Tiempos: t0: 0 días post tratamiento; t28: 28 días post tratamiento; t56: 56 días post tratamiento; t84: 84 días post tratamiento. 50 bp: marcador de peso molecular.

Los perfiles de TRFLP del marcador molecular *amoA* se analizaron en cada tratamiento durante el tiempo de incubación, utilizando dos enzimas de restricción. La frecuencia relativa de los principales TRFs durante el período de incubación para ambos tipos de microcosmos, se muestra en la Figura 18.

Los perfiles de TRFLP de ambos tipos de microcosmos mostraron diferencias en la diversidad de los filotipos de nitrificadores, aun cuando hubo TRFs comunes en ambos tipos de suelo tales como los de 35 pb, 113 pb y 166 pb que presentaron distintas abundancias relativas (Figura 18).

Los perfiles de TRFs también presentaron diferencias entre los tratamientos y durante el tiempo de incubación, siendo la mayoría de los casos cambios en la frecuencia relativa de los filotipos más que la presencia de nuevos filotipos. El cambio más notable se presentó en el tratamiento con Nr y ácido (tNrAc) en el microcosmos de suelo semiárido donde aparecieron nuevos filotipos durante la incubación. Por otra parte, los perfiles del suelo semiárido al inicio de la incubación no tuvieron un patrón común, lo que sugiere una mayor heterogeneidad espacial en el suelo semiárido. Sin embargo, en el caso del suelo árido todos los t0 presentaron los mismos TRFs (Figura 18).

Los resultados mostraron que unos pocos TRFs se mantuvieron durante todo el experimento independientemente del tipo de tratamiento o suelo, como es el caso del TRF de 166 pb. Este TRF fue común a ambos microcosmos y fue, durante todo el período de incubación, el más abundante en el suelo semiárido. En concordancia con esta observación, cuando se realizó una digestión *in silico* de los clones del gen *amoA* obtenidos para este suelo, un 71,4% presentó un TRF de 168 pb.

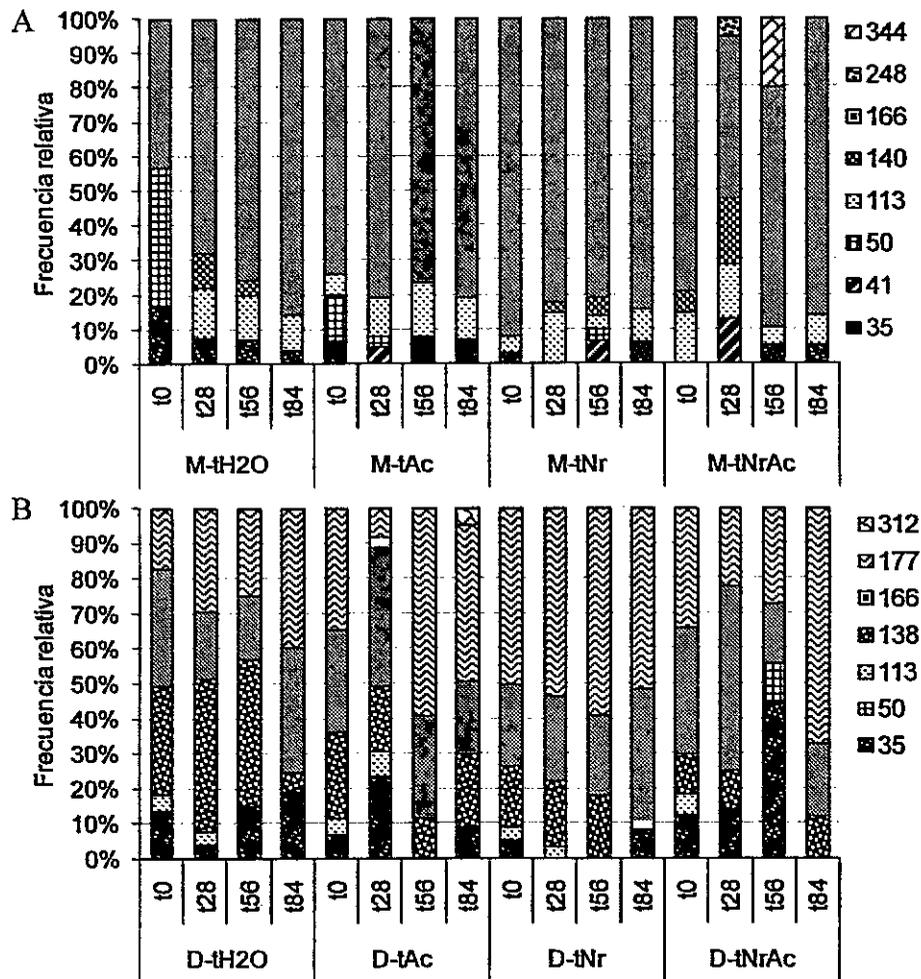


Figura 18. Frecuencia relativa de los principales TRFs obtenidos para el gen *amoA* a diferentes tiempos de incubación de los microcosmos de suelo A. semiárido (M: matorral) y B. árido (D: desierto). Se relacionan los TRFs (pares de bases), obtenidos con la enzima *HaeIII*, con la frecuencia relativa (% UF). Tratamientos: tH₂O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio (100 $\mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio (100 $\mu\text{g g}^{-1}$). Tiempos: t0: 0 días post tratamiento; t28: 28 días post tratamiento; t56: 56 días post tratamiento; t84: 84 días post tratamiento.

En el suelo árido no hubo dominancia de un solo fragmento, los TRFs de 35 pb, 138 pb, 166 pb y 177 pb dieron cuenta de la mayoría de la fluorescencia en todos los tratamientos durante la incubación de los microcosmos. La digestión *in silico* de los clones *amoA* del suelo árido del desierto mostró que un 32,1% de los clones produjeron un TRF de 143 pb, un 14,29% un TRF de 169 pb y un 20,7% el de 179 pb, coincidente con los encontrados experimentalmente en el perfil de TRFLP. La diferencia en 1-2 pb con el TRF experimental puede deberse al corrimiento que experimenta el perfil de TRFLP durante la secuenciación.

Por otra parte, los fragmentos de 41 pb, 140 pb, 248 pb y 344 pb estuvieron presentes en baja abundancia sólo en el suelo semiárido. A su vez, los TRFs de 138 pb, 177 pb y 312 pb se encontraron exclusivamente en el suelo árido, aunque en baja proporción y sólo en algunos tiempos y tratamientos.

El análisis de agrupamiento de los perfiles de TRFLP mostró, de manera general, que las comunidades bacterianas se separaron de acuerdo al tipo de suelo (Figura 19). Las muestras de suelo semiárido tuvieron una mayor similitud entre sí, en concordancia con la menor variación observada en los patrones de TRFLP para estas muestras. El suelo semiárido formó un grupo que incluyó a 14 de las 16 muestras analizadas, mientras que el grupo del suelo árido incluyó 15 de las 16. Dentro de cada grupo la mayoría de las muestras con Nr en el tratamiento tendieron a agruparse juntas. No se observó ninguna tendencia a que las muestras se agruparan según el tiempo de incubación de los microcosmos.

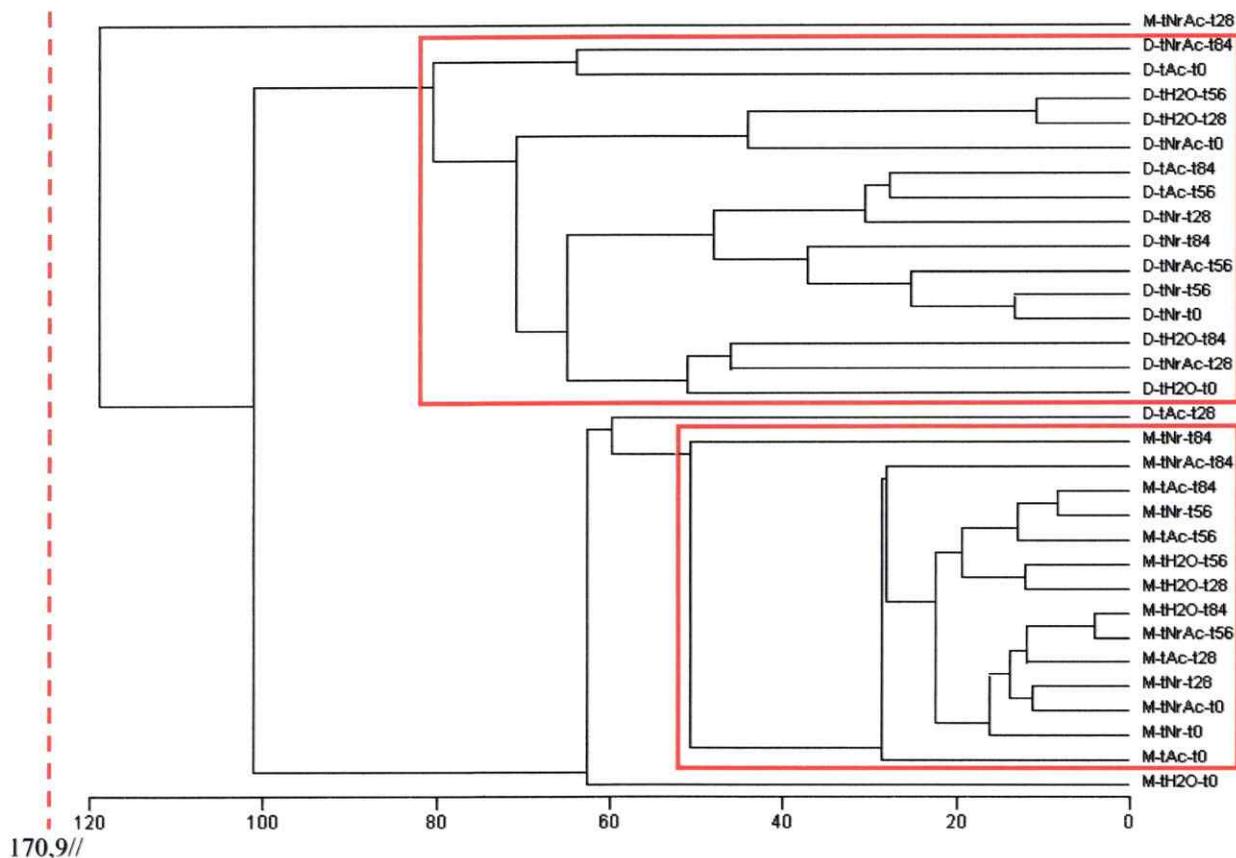


Figura 19. Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas de los suelos semiárido (M: matorral) y árido (D: desierto) bajo cada tratamiento y durante la incubación de los microcosmos. Se usaron como base los perfiles de TRFs del gen *amoA* obtenidos con dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *MspI*). El dendrograma fue construido usando la distancia Euclídeana y el algoritmo UPGMA (Programa MVSP). La línea punteada señala la distancia de agrupamiento crítico obtenida con la prueba de MonteCarlo con 1000 iteraciones (Programa Poptools). Tratamientos: tH2O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Tiempos: t0: 0 días post tratamiento; t28: 28 días post tratamiento; t56: 56 días post tratamiento; t84: 84 días post tratamiento.

El análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación en ambos microcosmos y para cada tratamiento se muestra en la Figura 20. Este análisis permitió corroborar el agrupamiento obtenido en el dendrograma pero a su vez determinar qué parámetros edáficos se relacionaron con el ordenamiento observado. Una fuerte correlación entre las variables edáficas podría afectar el análisis, haciendo los coeficientes de correlación muy inestables (Ter Braak 1990), sin embargo ninguno de los parámetros edáficos mostró una fuerte correlación con otro ($r > 0,9$) (Tabla 2). Los dos primeros ejes del agrupamiento representaron el 82,2% de la varianza total. Se observó una clara diferencia en la composición del gremio de nitrificadores entre ambos suelos a lo largo de los dos primeros ejes canónicos, siendo más similares entre sí las muestras del suelo semiárido. A su vez se observó una tendencia a que las muestras del suelo árido se separaran a lo largo del eje canónico 2 (CCA2) (Figura 20).

El ordenamiento del grupo de los nitrificadores estuvo determinado por el pH, la MO y el NO_3^- . Estos factores influyeron fuertemente sobre el eje canónico 1 (CCA1) con coeficientes de correlación intragrupo de -0,853, 0,887 y 0,900, respectivamente. Por lo tanto, estas variables dieron cuenta de la separación observada entre las comunidades de ambos tipos de suelo a lo largo del eje canónico 1 (CCA1). En cuanto al eje canónico 2 (CCA2), los factores edáficos que más pesaron sobre el agrupamiento observado fueron el pH y la MO, con coeficientes de correlación intragrupo de 0,396 y -0,409, respectivamente. Estos factores explicarían la separación observada entre las muestras de ambos tipos de suelo y las muestras de suelo árido entre sí a lo largo del eje canónico 2 (CCA2) (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficientes canónicos y de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los TRFLP del gen *amoA*, en los microcosmos de suelo árido y semiárido.

Parámetros edáficos ^a	Coeficiente de correlación intra-grupo		Coeficiente canónico		F	P
	CCA1	CCA2	CCA1	CCA2		
pH*	-0,853	0,396	-0,422	1,109	23,60	0,0080
ORP	0,154	-0,057	-0,288	-0,242	1,70	0,0960
CH	0,338	-0,271	0,259	0,169	1,24	0,2280
MO*	0,887	-0,409	-0,249	-0,762	16,21	0,0010
NH ₄ ⁺	0,022	-0,221	-0,231	-0,666	1,42	0,1820
NO ₃ ⁻	0,900	0,074	0,914	1,795	2,07	0,0370
1° eje canónico*					21,16	0,0010
Suma de los ejes canónicos*					10,42	0,0010

* Relaciones estadísticamente significativas entre las variables edáficas y el agrupamiento de las muestras según el análisis de MonteCarlo con 1000 permutaciones de la matriz (Programa Canoco).

^a pH; potencial de óxido reducción (ORP); contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH₄⁺); contenido de nitrato (NO₃⁻).

El análisis de MonteCarlo del CCA indicó una relación estadísticamente significativa entre la diversidad genética de los nitrificadores y los factores edáficos pH (F = 23,60; P = 0,0080), MO (F = 1,70; P = 0,0960) y NO₃⁻ (F = 23,60; P = 0,0080). Además, tanto el primer eje canónico (F = 21,16; P = 0,0010), como la suma de los ejes canónicos (F = 10,42; P = 0,0010), fueron estadísticamente significativos.

3.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PRECIPITACIÓN ÁCIDA DE NITRÓGENO REACTIVO SOBRE LA DIVERSIDAD METABÓLICA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA

La actividad metabólica de la comunidad microbiana total en los microcosmos, se evaluó al inicio (t0), a la mitad (t42) y al final (t84) del período de incubación de los microcosmos. En este ensayo se determinó el uso de diferentes fuentes de carbono en respuesta a los

tratamientos aplicados. A partir de los datos obtenidos se determinaron los valores de Diversidad Metabólica de la Comunidad (CMD) para todos los ensayos y se construyeron las curvas de CMD versus tiempo para los microcosmos del suelo semiárido (Figura 21) y del suelo árido (Figura 22), las cuales representan el promedio de fuentes de carbono utilizadas durante el tiempo de incubación de las muestras en las placas del ensayo fisiológico.

De manera general, en los microcosmos de ambos tipos de suelo, la utilización de las fuentes de carbono se inició luego de 48 h de incubación de las placas. Los resultados mostraron que el número total de fuentes de carbono utilizadas por la microbiota en los microcosmos fue mayor en el suelo semiárido que en el árido. No se observaron diferencias significativas dependientes del tratamiento aplicado. Sin embargo, cuando se comparan los microcosmos de suelos semiáridos con aquellos de suelos áridos se observaron diferentes patrones de actividad metabólica. En los microcosmos de suelos semiáridos, el número de fuentes de carbono utilizadas disminuyó levemente durante la incubación, siendo mayor la disminución en los tratamientos con Nr en el tiempo 84, al final del ensayo (Figura 21). En los microcosmos con suelo árido, se observó un aumento en la utilización de fuentes de carbono en el tiempo 42 de incubación en todos los tratamientos, mientras que al final de la incubación no se detectó actividad (Figura 22).

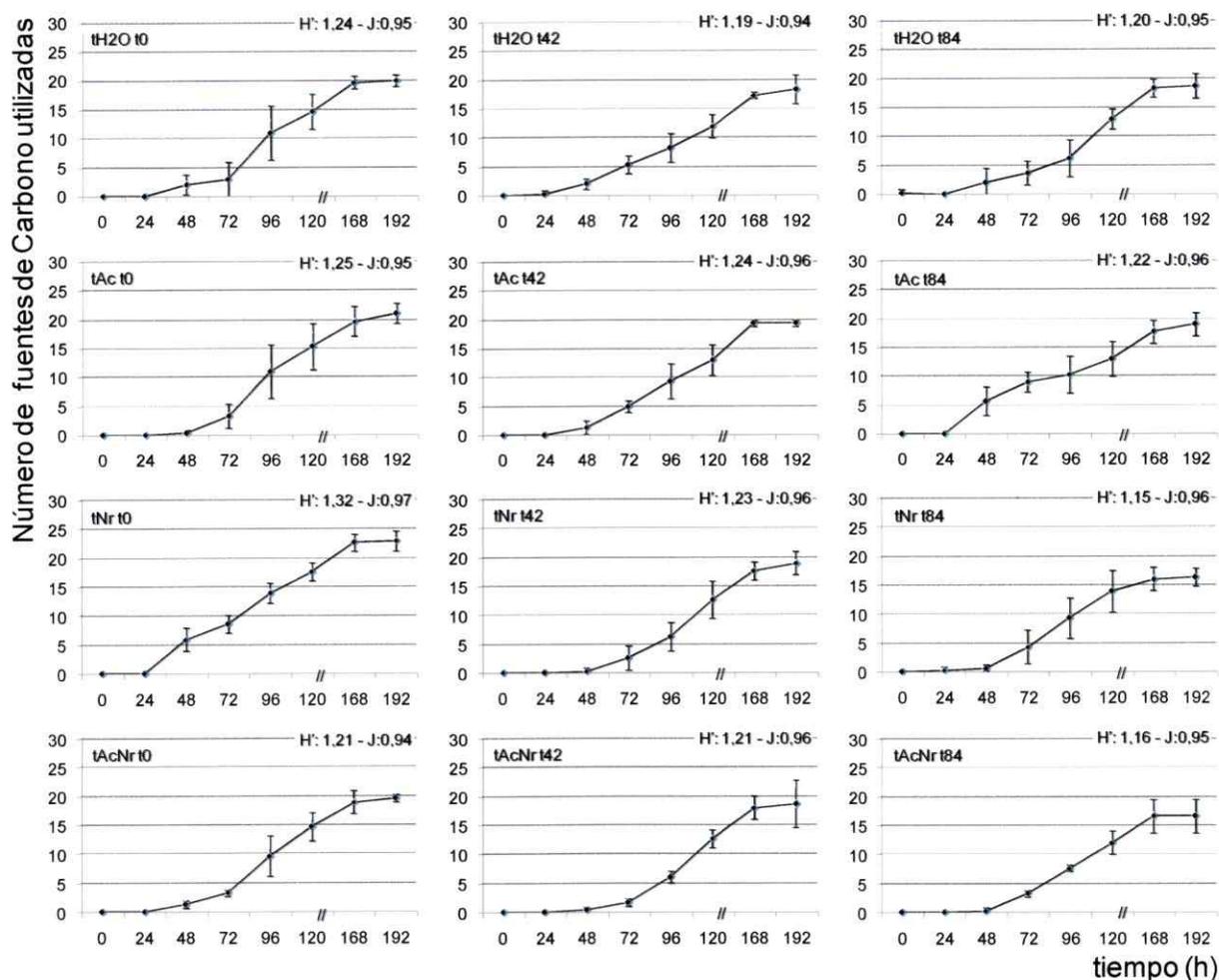


Figura 21. Curvas de Diversidad Metabólica de las Comunidades (CMD) promedio \pm E.E. para cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos de suelo semiárido (matorral). Tratamientos: tH2O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Tiempos: t0: 0 días post tratamiento; t42: 42 días post tratamiento; t84: 84 días post tratamiento. H': índice de diversidad de Shannon; J: índice de equitatividad.

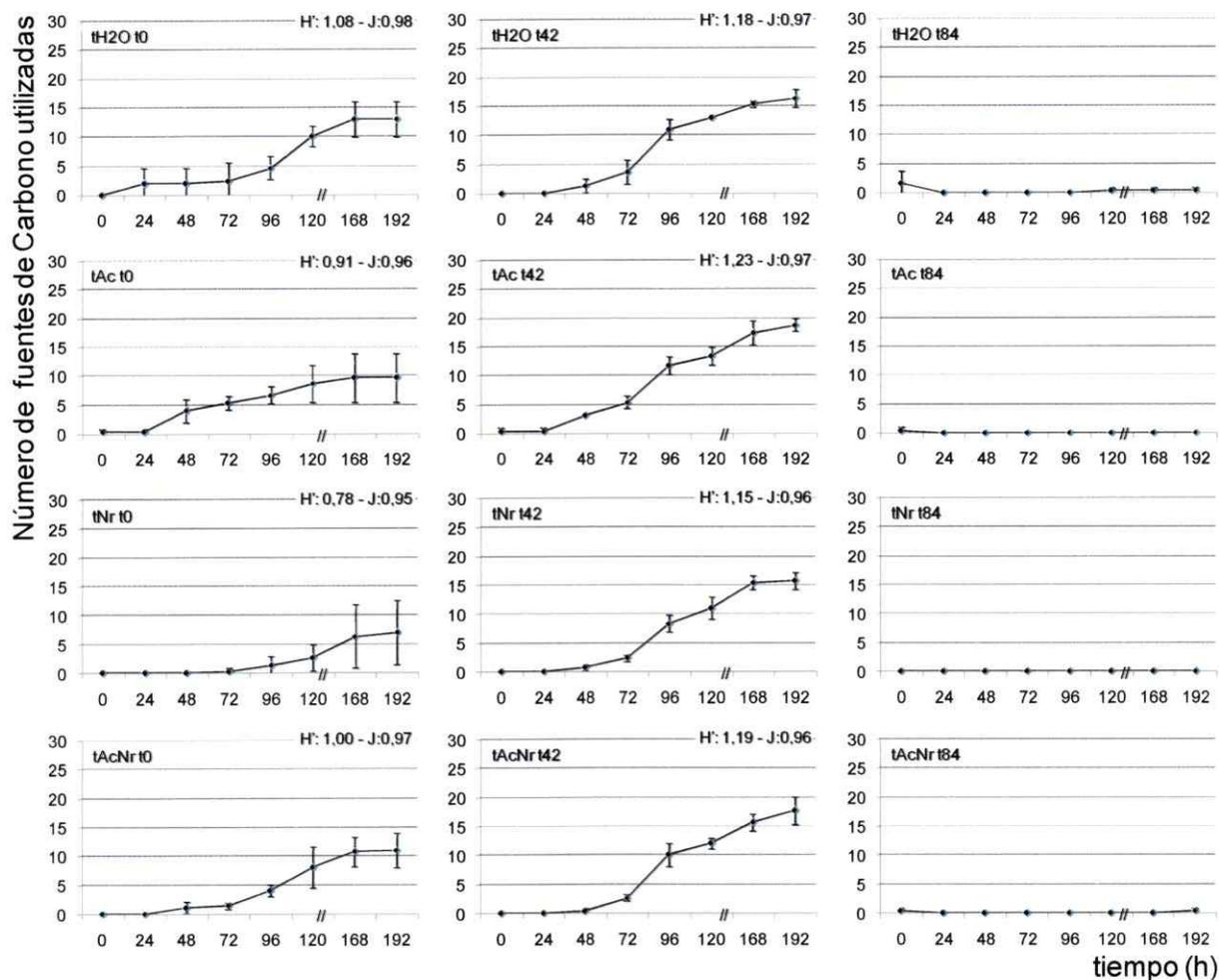


Figura 22. Curvas de Diversidad Metabólica de las Comunidades (CMD) promedio \pm E.E. para cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos de suelo árido (desierto). Tratamientos: tH2O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Tiempos: t0: 0 días post tratamiento; t42: 42 días post tratamiento; t84: 84 días post tratamiento. H': índice de diversidad de Shannon; J: índice de equitatividad.

De acuerdo al ANOVA de dos-vías, los índices de diversidad (H') y la riqueza metabólica (S) estuvieron significativamente influenciados por el tiempo de incubación de los microcosmos ($P = 0,0077$ y $P = 0,0060$, respectivamente). Este factor explicó más del 20% de la varianza total para el suelo semiárido (24,46% y 27,77% para diversidad y riqueza, respectivamente) y más del 40% para el suelo árido (43,29% y 58,29% para diversidad y riqueza, respectivamente). Sin embargo, los índices de equitatividad prácticamente no difirieron ni por los tratamientos ni con el tiempo de incubación (Tabla A3, Anexos).

El análisis de agrupamiento de los patrones metabólicos, mostró que las comunidades bacterianas del suelo árido se separaron de las muestras de suelo semiárido. Además, se observó una tendencia a que las muestras de cada tipo de suelo se agruparan de acuerdo al tiempo de incubación de los microcosmos sin influencia aparente de los tratamientos aplicados (Figura 23). El dendrograma indica que hay una mayor disimilitud entre las muestras de suelo semiárido comparadas con aquellas del suelo árido, ya que aparecen distribuidas en más de un grupo.

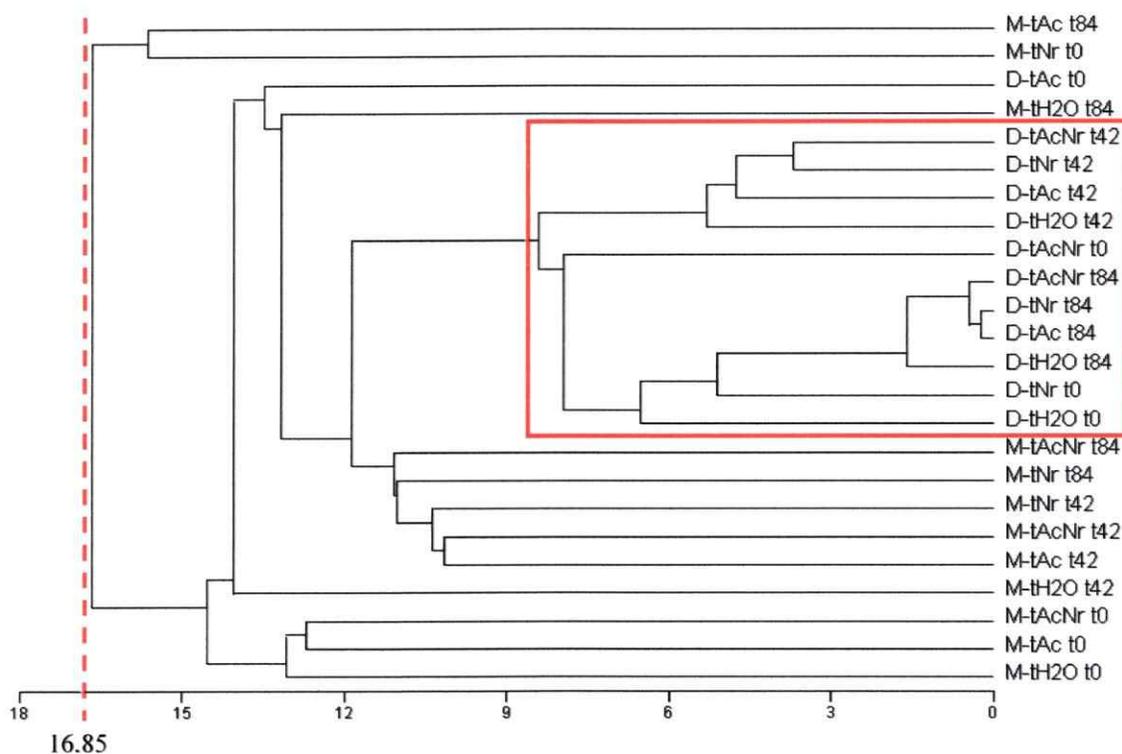


Figura 23. Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas del suelo semiárido (M: matorral) y árido (D: desierto) bajo cada tratamiento durante la incubación de los microcosmos. Se usaron como base las fuentes de carbono utilizadas durante el ensayo de CLPP. El dendrograma se construyó usando la distancia Euclídeana y el algoritmo UPGMA (Programa MVSP). La línea punteada señala la distancia de agrupamiento crítico obtenida con la prueba de MonteCarlo con 1000 iteraciones (Programa Poptools). Tratamientos: tH2O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Tiempos: t0: 0 días post tratamiento; t42: 42 días post tratamiento; t84: 84 días post tratamiento.

El análisis de correspondencia canónica entre los CLPP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido y árido reveló que las muestras de los microcosmos de ambos tipos de suelo presentaron diferentes perfiles fisiológicos comunitarios (CLPP), separándose en dos grupos bien definidos. Las muestras de cada tipo de suelo se agruparon de acuerdo al tiempo de incubación de los microcosmos, independientemente del tratamiento recibido. Los agrupamientos obtenidos mostraron que los parámetros edáficos que determinaron la separación de las muestras de ambos tipos de suelo en el tiempo fueron el pH y la MO (Figura 24).

Los dos primeros ejes del agrupamiento representaron el 45,4% de la varianza total. Se observó una clara diferencia en la actividad metabólica de ambos suelos a lo largo del primer eje canónico (CCA1). A su vez se confirmó mediante este ordenamiento la separación de las muestras de acuerdo al tiempo de incubación a lo largo del segundo eje canónico (CCA2) (Figura 24).

El pH y la MO influyeron fuertemente sobre el eje canónico 1 (CCA1) con coeficientes de correlación intragrupo de 0,775 y -0,865, respectivamente. Estas variables dieron cuenta de la separación observada entre las actividades metabólicas de ambos tipos de suelo a lo largo del eje canónico 1 (CCA1). En cuanto al eje canónico 2 (CCA2), el factor edáfico que más pesó sobre el agrupamiento observado fue el CH, con un coeficiente de correlación intragrupo de -0,591. El CH por tanto explicaría la separación observada entre las muestras de ambos tipos de suelo según el tiempo de incubación de los microcosmos (Tabla 4).

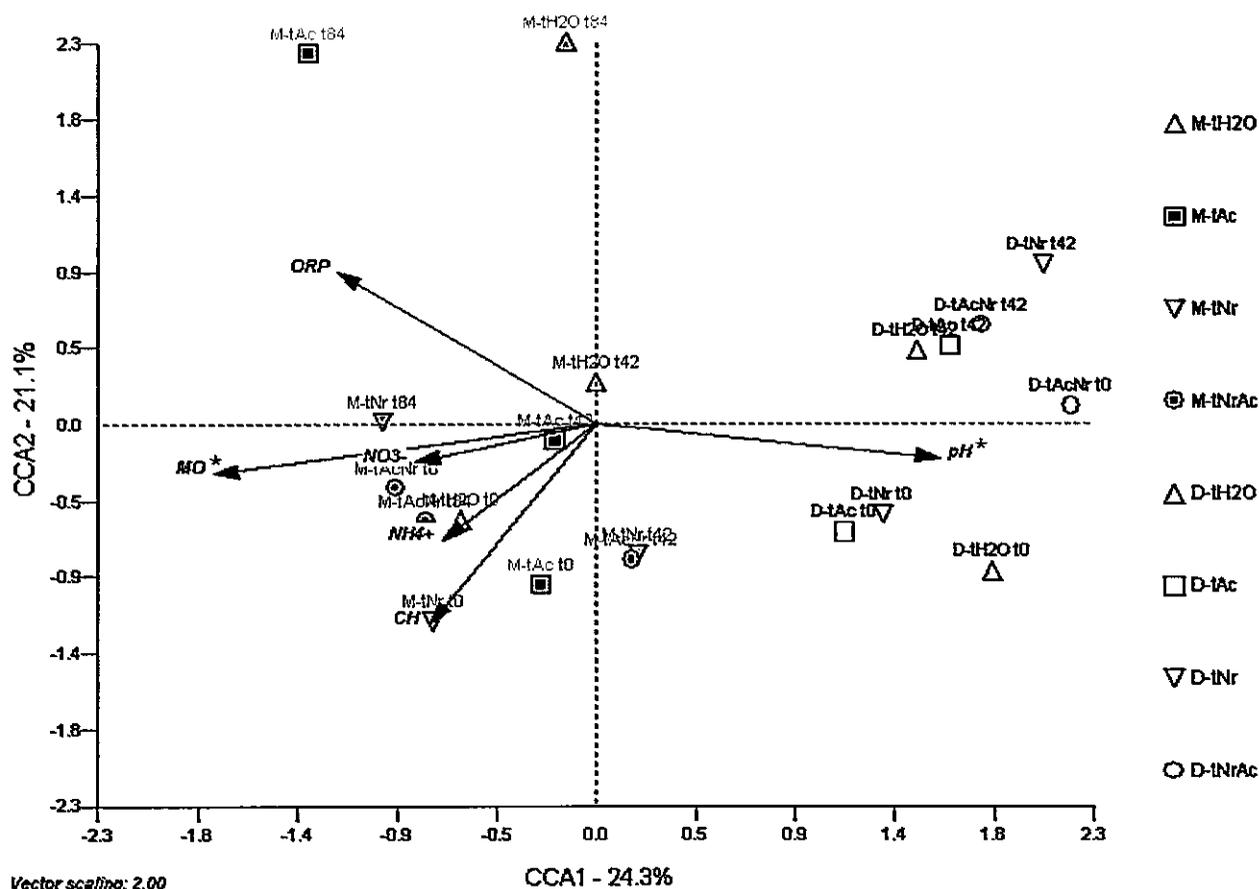


Figura 24. Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles fisiológicos (CLPP) y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de suelo semiárido (M: matorral) y árido (D: desierto). Tratamientos: tH2O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Tiempos: t0: 0 días post tratamiento; t28: 28 días post tratamiento; t56: 56 días post tratamiento; t84: 84 días post tratamiento. Parámetros edáficos: pH; potencial de óxido reducción (ORP); contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH_4); contenido de nitrato (NO_3). * Relaciones estadísticamente significativas entre las variables edáficas y el agrupamiento de las muestras, según el análisis de MonteCarlo con 1000 permutaciones de la matriz (Programa Canoco).

Tabla 4. Coeficientes canónicos y de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los CLPP, en los microcosmos de suelo árido y semiárido.

Parámetros edáficos ^a	Coeficiente de correlación intra-grupo		Coeficiente canónico		F	P
	CCA1	CCA2	CCA1	CCA2		
pH*	0,775	-0,100	-0,357	-0,821	6,39	0,0010
ORP	-0,588	0,449	-0,500	-0,095	0,99	0,3580
CH	-0,379	-0,591	-0,065	-1,832	0,93	0,5130
MO*	-0,865	-0,146	-1,272	0,627	2,06	0,0010
NH ₄ ⁺	-0,348	-0,340	-0,014	0,598	1,01	0,3540
NO ₃ ⁻	-0,409	-0,111	0,360	-1,557	1,12	0,2330
1° eje canónico*					4,77	0,0010
Suma de los ejes canónicos*					2,15	0,0010

* Relaciones estadísticamente significativas entre las variables edáficas y el agrupamiento de las muestras según el análisis de MonteCarlo con 1000 permutaciones de la matriz (Programa Canoco).

^a pH; potencial de óxido reducción (ORP); contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH₄⁺); contenido de nitrato (NO₃⁻).

El análisis de MonteCarlo del CCA indicó una relación estadísticamente significativa entre la diversidad metabólica de la comunidad bacteriana total y los factores edáficos pH (F = 6,39; P = 0,0010) y MO (F = 2,06; P = 0,0010). Además, tanto el primer eje canónico (F = 4,77; P = 0,0010), como la suma de todos los ejes canónicos (F = 2,15; P = 0,0010), fueron estadísticamente significativos.

DISCUSIÓN

En general hay escasa información sobre la diversidad genética y funcional de la microbiota de ecosistemas áridos o semiáridos porque se considera que en estos ecosistemas hay reducida actividad microbiana como consecuencia del bajo contenido hídrico (Otter & Scholes 2005). Sin embargo, estos ambientes extremos pueden albergar una gran diversidad de microorganismos (Bhatnagar & Bhatnagar 2005) que constituyen una fuente de recursos genéticos cuyas propiedades metabólicas les permiten resistir o tolerar condiciones de estrés hídrico, limitación de nutrientes, entre otras (Chanal y col. 2006; Rainey y col. 2005). Comunidades microbianas con una composición particular podrían responder de manera diferente a las perturbaciones ambientales como el ingreso ácido de nitrógeno, modificando tanto la actividad como la diversidad estructural de los grupos bacterianos que gobiernan este ciclo.

4.1. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA TOTAL, DE LOS NITRIFICADORES Y DENITRIFICADORES EN EL SUELO SEMIÁRIDO DEL MATORRAL Y EL SUELO ÁRIDO DEL DESIERTO

Varios estudios en ecología muestran una relación positiva entre diversidad y estabilidad (Ives & Carpenter 2007). Según McCann (2000), la estabilidad de los ecosistemas depende de la habilidad de las comunidades de sustentar especies o grupos funcionales capaces de responder diferencialmente a factores bióticos y abióticos. De acuerdo a los datos obtenidos

en esta tesis la composición de la comunidad bacteriana de estos suelos, revela la presencia de numerosos filotipos que se distribuyen en distintos linajes del dominio bacteria. De acuerdo a las curvas de rarefacción de los clones del gen rDNA 16S (Figura 12), las comunidades bacterianas de los suelos analizados, presentaron una alta diversidad. Estos resultados revelan que el grado de diversidad es comparable o mayor al encontrado por otros autores a partir de librerías génicas del rDNA 16S obtenidas desde suelos de bosques (Hackl y col. 2004), suelos áridos de Arizona (Dunbar y col. 1999; 2002) y praderas antropogénicas (Marilley & Aragno 1999; McCaig y col. 1999). Algunos autores sugieren que un bajo contenido hídrico podría explicar la alta diversidad encontrada en el horizonte superficial de suelos con bajo contenido de carbono (Zhou y col. 2002; 2004; Becker y col. 2006). Según estos trabajos la falta de agua limitaría la comunicación entre microhábitats 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 unos recursos que son escasos pero, probablemente, heterogéneos. Estas condiciones permitirían el mantenimiento de comunidades más diversas y equitativas. Por otro lado, el pH es considerado a nivel global el mejor descriptor de la diversidad y riqueza de ensamblajes microbianos, siendo los suelos con pH neutro los más diversos y disminuyendo la diversidad con un aumento de la acidez (Fierer & Jackson 2006). De acuerdo a esto, la alta diversidad observada en los suelos estudiados puede deberse también al pH cercano a la neutralidad medido en ambos suelos, siendo un poco más ácido el pH del suelo semiárido que el del suelo árido. Dado que el

número de clones obtenidos no fue suficiente para cubrir toda la diversidad para ambos tipos de suelo, no se puede confirmar que el pH original del suelo haya influido en la diversidad bacteriana determinada. Sin embargo, el número de grupos filogenéticos a los que se asociaron los clones del gen rDNA 16S del suelo árido del desierto (Figura 7) fue mayor que el del suelo semiárido del matorral, pudiéndose relacionar esta mayor diversidad a la influencia del pH.

Janssen (2006) revisó la bibliografía que existe sobre la diversidad microbiana determinada mediante librerías génicas del rDNA 16S incluyendo suelos de diferentes tipos de bosques, praderas de diferente origen y matorrales semiáridos. Este autor encontró que, en promedio, el 92% de los clones del rDNA 16S pertenecieron a 4 *phyla* dominantes: Proteobacteria (39%), Acidobacteria (20%), Actinobacteria (13%), Verrumicrobia (7%). Mientras que grupos tales como Bacteriodetes (5%), Chloroflexi (3%), Planctomycetes (2%), Gemmatimonadetes (2%), y Firmicutes (1,8%) estuvieron menos representados. En contraste, suelos arenosos de la subsuperficie muestreados por Zhou y col. (2004) revelaron comunidades con mucho menos diversidad pero aún dominados por el *phylum* Proteobacteria (90%) acompañado por Acidobacteria (3%) y Firmicutes (3%). Nagy y col. (2005) previamente reportaron un cambio en esta distribución a 51% Acidobacteria, 15,5% Proteobacteria, 13,3% Flexibacteria, 6,7% Actinobacteria y 4,5% Planctomycetes para la superficie de suelos áridos. Esta distribución muestra un leve incremento en la abundancia relativa de Planctomycetes en este tipo de suelos. Un reporte previo, usando perfiles de ácidos grasos (PLFA), mostró que la comunidad microbiana en el Desierto de Atacama estuvo compuesta principalmente por Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes (Lester y

col. 2007).

En suelos semiáridos del matorral xerofítico de Fray Jorge, Chile, Acidobacteria se encontró como predominante, seguido por Alphaproteobacteria y Bacteroidetes (Guevara 2007). Sin embargo, a diferencia de lo observado en ese trabajo, Gamma y Deltaproteobacteria no se encontraron en el suelo semiárido del matorral esclerófilo (Figura 6). Asimismo, la diversidad filogenética, ubicuidad y abundancia de Acidobacteria en muchos tipos de suelo, sugiere que este grupo tiene una importante función ecológica y una amplia diversidad metabólica. No obstante, la información acerca de este *phylum* es muy escasa y deriva principalmente de librerías génicas y unas pocas cepas cultivadas (Quaiser y col. 2003). En otras latitudes, la mayoría de las genotecas fueron obtenidas de suelos de praderas (naturales y antropogénicas) o de bosques (Borneman & Triplett 1997; Marilley & Aragno 1999; McCaig y col. 1999; Zhou y col. 2003), siendo los matorrales semiáridos los menos estudiados (Kuske y col. 1997; Dunbar y col. 1999; 2002; Holmes y col. 2002).

Tradicionalmente, usando métodos dependientes de cultivo, los firmicutes fueron considerados el grupo más abundante en todos los tipos de suelo (Janssen 2006). Sin embargo, el uso de técnicas independientes de cultivo mostraron que este grupo es menos numeroso, sugiriendo que son fáciles de cultivar o sus células son dificultosas de lisar y por ende más difíciles de detectar por técnicas basadas en DNA-PCR. Sin embargo, la alta proporción de este grupo encontrada en el suelo árido del desierto (Figura 7) sugiere que bacterias formadoras de endosporas tales como especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* pueden constituir una alta proporción de la microbiota de los suelos del desierto (Kieft 2002; Lester y col. 2007).

Por otro lado, la dominancia de secuencias de nitrificadores relacionadas a *Nitrosospira* se corresponde con la amplia distribución observada para este género en ambientes terrestres (Whitby y col. 2001). Es importante enfatizar que no se encontraron secuencias relacionadas al género *Nitrosomonas*, otro género de bacterias nitrificantes descrito en varios ambientes tales como lagos (Whitby y col. 2001), sedimentos marinos (Stephen y col. 1996; Kowalchuk & Stephen 2001) y diversos tipos de suelos (Stephen y col. 1996; Bothe y col. 2000; Kowalchuk y col. 2000; Kowalchuk & Stephen 2001). Los resultados de este trabajo son coherentes con la literatura consultada que indica una dominancia de *Nitrosospira* sobre *Nitrosomonas* en suelo (Mednum y col. 1999; Kowalchuk & Stephen 2001; Whitby y col. 2001; Avrahami y col. 2002). Secuencias de clones y bacterias oxidadoras de amonio agrupadas dentro de la clase Betaproteobacteria fueron divididas en al menos siete grupos en base a las secuencias del rDNA 16S (Purkhold y col. 2000; Stephen y col. 1996). Los clones obtenidos en este trabajo se agruparon sólo con especies de *Nitrosospira* del grupo 3 (Figuras 8 y 9), el cual ha sido dominante en estudios moleculares de la diversidad de oxidadores de amonio en suelos (Hiorns y col. 1995; Stephen y col. 1996; 1998; Bruns y col. 1999; Mendum y col. 1999; Phillips y col. 2000) y el cual contiene la mayoría de los representantes cultivables de este género. Además, el grupo 3 de *Nitrosospira* ha sido detectado como el grupo de oxidadores de amonio dominante en suelos agrícolas fertilizados y con un pH neutro (Stephen y col. 1996; 1998; Bruns y col. 1999; Mendum y col. 1999; Kowalchuk y col. 2000). Dado que las secuencias del gen *amoA* sólo se agruparon a bacterias del género *Nitrosospira* del grupo 3, se puede inferir que el grupo de nitrificadores de estos suelos no es muy diverso. Se han descrito

bacterias del ciclo del nitrógeno en otros ecosistemas desérticos, entre ellas miembros del género *Nitrosospira*, los cuales aparecen como los principales oxidadores de amonio en suelos del Desierto de Negev (Nejidat 2005). Asimismo, se ha detectado actividad nitrificante en comunidades microbianas constituyentes de costras biológicas (Johnson y col. 2005), lo que sugiere que en estos ecosistemas existiría un potencial de reciclamiento del nitrógeno.

De acuerdo a la literatura y bases de datos consultadas, los clones del gen *nirS* de las bacterias desnitrificadoras son escasos en los suelos. Sin embargo, como pudo observarse en este estudio, se encontraron numerosas secuencias del gen *nirS* que se distribuyeron a lo largo de todo el árbol filogenético, por lo que se puede concluir que estos suelos contienen una mayor diversidad del gen *nirS* que del gen *nirK* (Figuras 10, 11 y 12). Algunas de las secuencias tanto del gen *nirS* (Figura 11) como del gen *nirK* (Figura 10) se agruparon separadas del resto de las secuencias incluidas en el análisis, revelando la presencia de una diversidad desconocida de desnitrificadores en el suelo semiárido. Varios trabajos han concluido que los desnitrificadores que presentan el gen *nirS* son preferentemente encontrados en ambientes marinos y que los que tienen el gen *nirK* son predominantes en suelo (Avrahami y col. 2002; Priemé y col. 2002), sin embargo se ha sugerido que esta afirmación debe ser revisada (Throbäck y col. 2004). A pesar de los esfuerzos realizados, no se pudo detectar la presencia de genes de desnitrificadores en el suelo árido. Los suelos del desierto tienen generalmente bajo contenido de materia orgánica, bajo contenido hídrico y tienden a presentar pH ligeramente básico, todas condiciones que inhiben el crecimiento de bacterias desnitrificantes (Kieft 2002).

Los datos obtenidos en este trabajo mostraron que un importante número de secuencias de los diferentes marcadores analizados se agruparon separadas o sólo relacionadas a clones ambientales, sugiriendo que estos ambientes podrían estar colonizados por bacterias exclusivas de estos suelos.

4.2. EFECTO DE LA PRECIPITACIÓN ÁCIDA DE NITRÓGENO REACTIVO SOBRE LOS PARÁMETROS EDÁFICOS Y LAS ACTIVIDADES MICROBIANAS

En la mayoría de los ecosistemas terrestres, los suelos de la superficie experimentan períodos de sequía seguidos por una relativamente rápida rehidratación debido a las precipitaciones. Los suelos de ecosistemas áridos son particularmente susceptibles a este estrés hídrico debido a las infrecuentes precipitaciones y al clima seco y caluroso que favorece la rápida desecación de los suelos (Austin y col. 2004).

Las diferencias de comportamiento de ambos suelos probablemente son una manifestación de la diferente biomasa y materia orgánica presentes en cada uno. El contenido de materia orgánica fue el factor que mejor se correlacionó con la abundancia de bacterias (Kandeler y col. 2006) y el incremento en la disponibilidad de sustratos en suelos de textura fina, como los del suelo semiárido del matorral, resultaron en una respuesta mayor a ciclos de sequía-precipitación que suelos arenosos con bajo contenido de materia orgánica como los suelos áridos del desierto (Austin y col. 2004).

En los microcosmos estudiados en esta tesis el contenido hídrico no se mantuvo constante durante el período experimental. El contenido hídrico se modificó al inicio del experimento con la aplicación de los tratamientos y luego fue disminuyendo a lo largo de la

incubación del microcosmos. Esta forma de aplicación de los tratamientos se hizo con el propósito de simular las condiciones de lluvia en el ambiente (pulsos de agua). El aumento inicial en el contenido hídrico del suelo de los microcosmos podría haber favorecido la actividad de desnitrificación observada durante este período (Figura 15). Otros estudios han mostrado un incremento a corto plazo en las emisiones de NO y N₂O por un aumento en la humedad del suelo (Groffman & Tiedje 1988; Davidson y col. 1993; Scholes y col. 1997); sin embargo, no es claro si las tasas de desnitrificación observadas fueron de suficiente magnitud para explicar la disminución en el contenido de NO₃⁻ (Fierer y col. 2002).

La posterior pérdida de agua producida durante la incubación de los microcosmos aparece asociada a la reducción del pH (Figura 13), esta acidificación podría explicarse por la producción de protones por procesos químicos y microbiológicos dependientes de oxígeno, como tasas de nitrificación aumentadas (Figura 15), de acuerdo con lo propuesto por Lamers y col. (1998). Esta acidificación también podría ocurrir por mineralización luego de un cambio en la humedad del suelo desde húmedo a seco (De Vries & Breeuwsma 1987).

Los nitrificadores son considerados como altamente sensibles a la disponibilidad de agua (Stark & Firestone 1995), no obstante el incremento observado en los potenciales de nitrificación (Figuras 14 y 15) sugiere que aún cuando la actividad nitrificante es sensible a períodos de baja humedad, las bacterias oxidadoras de amonio del suelo semiárido fueron capaces de sobrevivir al período de sequía luego de aplicados los tratamientos (Figura 13), al igual que lo encontrado por Fierer y col. (2002). Luego de un incremento en la producción de NO₃⁻, siguiendo el consumo inicial por desnitrificación (Figura 15), hubo una baja adicional en el contenido de NO₃⁻ en la segunda mitad de la incubación de los microcosmos

(Figura 14). Estos resultados sugieren que el consumo por parte de la biomasa microbiana pudo haber excedido la producción de NO_3^- . Aunque se ha descrito que el NO_3^- no es la forma nitrogenada favorita para el anabolismo microbiano, cuando las concentraciones de NH_4^+ son bajas, como en estos suelos hacia la segunda mitad de la incubación de los microcosmos (Figura 13), el consumo de NO_3^- puede aumentar (Davidson y col. 1990).

A pesar de ser un proceso natural, la nitrificación puede tener impactos negativos en muchos ambientes, especialmente aquellos expuestos a niveles elevados de precipitación de nitrógeno (Prosser 1989; van Breemen & van Dijk 1988). El ingreso de N_r en forma de óxidos de nitrógeno tiene un efecto acidificante directo sobre el suelo, mientras que el ingreso como NH_4^+ puede ser una fuente adicional de acidificación como resultado de nitrificación y consumo biológico (van Breemen y col. 1983; Beiderbeck y col. 1996).

En suelos, los oxidadores de amonio conforman un grupo funcional relevante dentro de la comunidad bacteriana, siendo principalmente responsables del primer paso en la oxidación del NH_4^+ inmóvil a un NO_3^- altamente móvil vía NO_2^- (Prosser 1989). Este proceso involucra una concomitante liberación de protones, los cuales pueden llevar a una acidificación significativa del suelo donde el ingreso de NH_4^+ es alto (Beiderbeck y col. 1996), lo cual podría explicar la reducción de pH observada en los microcosmos (Figura 13).

Uno de los mayores problemas asociados con la nitrificación es la contaminación de las capas subterráneas de agua debido a la lixiviación de NO_3^- (Kowalchuck & Stephen 2001). Aunque este aspecto no puede ser evaluado en los ensayos de microcosmos, se ha descrito que la pérdida por lixiviación hacia las capas subterráneas es muy baja en

ecosistemas áridos (Peterjohn & Schlesinger 1991). Igualmente, el escurrimiento a través de la superficie se considera muy escaso o inexistente en estos suelos, aunque las pérdidas de nitrógeno durante los infrecuentes eventos hidrológicos no están bien cuantificadas (Adams 2003).

El aumento en el contenido de nitrato en los microcosmos tratados con Nr (Figura 14) concuerdan con lo observado por Stursova y col. (2006) que determinó que las respuestas microbianas a la precipitación de Nr en suelos áridos fueron diferentes a las de ecosistemas boscosos y parecen estar moduladas por la acumulación de nitrógeno inorgánico lo cual podría estar ligado a los patrones de precipitación. En un suelo semiárido del chaparral del sur de California, un ecosistema similar al matorral de Chile central, la mineralización total de nitrógeno se incrementó linealmente con la precipitación de Nr, y el NO_3^- dio cuenta de un 95% del nitrógeno inorgánico acumulado durante una incubación de 50 semanas (Vourlitis y col. 2007).

Se ha descrito, que durante los inter-pulsos de agua, el recambio de carbono y nitrógeno se enlentece y ocurre la muerte microbiana, llevando a un incremento en el nitrógeno y la materia orgánica lábil del suelo. Cuando los suelos se humedecen, se observa comúnmente rápida estimulación de la mineralización de carbono y nitrógeno (Birch 1958; Sorensen 1974; Scheu & Parkinson 1994; Cui & Caldwell 1997; Franzluebbers y col. 2000). Además, el rápido cambio en el potencial de agua puede causar que los microorganismos sufran un choque osmótico, induciendo la lisis celular (Bottner 1985; van Gestel y col. 1993) o una liberación de solutos intracelulares (Halverson y col. 2000). Estos sustratos conteniendo carbono y nitrógeno lábiles pueden ser rápidamente mineralizados por los

microorganismos remanentes (Birch 1958; Kieft y col. 1987). Alternativamente, el estrés hídrico puede provocar que los agregados de suelo se rompan, exponiendo materia orgánica físicamente protegida (Adu & Oades 1978; Lundquist y col. 1999). Esta materia orgánica previamente no disponible podría ser rápidamente mineralizada por la comunidad microbiana (Appel 1998).

La desnitrificación es un proceso que requiere bajos niveles de oxígeno, como los encontrados en humedales, así que no se espera que las pérdidas de nitrógeno vía desnitrificación puedan ser rápidas en los ecosistemas áridos luego de los eventos de precipitación (Figuras 15 y 16) (Peterjohn & Schlesinger 1991; Evans & Belnap 1999). Aunque los efectos de una deposición elevada de Nr sobre las tasas de desnitrificación no han sido cuantificados en la mayoría de los ecosistemas naturales, debería esperarse una estimulación de la desnitrificación medida como producción de N_2O (Goulding y col. 1998). Sin embargo, la acumulación de NO_3^- (Figura 14) no tuvo un efecto significativo sobre las tasas de producción de N_2O (Figura 15), excepto en la etapa inicial de la incubación de los microcosmos. Este resultado es consistente con el trabajo de McLain & Martens (2006a; 2006b) sobre las transformaciones de nitrógeno en suelos semiáridos, donde el flujo de N_2O no estuvo correlacionado con la concentración de NO_3^- , la humedad o la respiración. Los autores concluyeron que la mayoría del flujo de N_2O desde suelos áridos fue generado a través de la mineralización de proteínas y aminoácidos, más que por respiración anaeróbica de NO_3^- y que los hongos fueron los principales organismos nitrificadores. Las poblaciones fúngicas no estarían restringidas a las capas de agua en el suelo y son capaces de crecer y permanecer activas aún bajo condiciones de sequía (Cooke & Rayner 1984). Estos

resultados contrastan con los de suelos templados, donde la generación de N_2O es principalmente realizada por procariotas y la desnitrificación da cuenta para la mayoría del flujo de N_2O (Stursova y col. 2006).

A pesar de que numerosos trabajos reportan la obtención de flujos negativos de N_2O , como los observados en los microcosmos estudiados (Figura 15), aún no existe una investigación sistemática de este fenómeno. Se ha observado un consumo neto de N_2O bajo diferentes condiciones, lo que hace difícil identificar las condiciones apropiadas para que esto ocurra (Chapuis-Lardy y col. 2007). Los flujos negativos de N_2O se encuentran confinados generalmente a ecosistemas limitados en nitrógeno (e.g. Glatzel & Stahr 2001). Sin embargo, más allá de la controversia que pueden desencadenar las tasas negativas, lo que es claro es que el flujo de N_2O obtenido en la interfase entre el suelo y la atmósfera es el resultado de la dinámica de los procesos de producción y consumo en el suelo. Demostrando de esta manera que la actividad de desnitrificación en los suelos estudiados es dependiente de la disponibilidad de agua y nitrógeno reactivo (Figuras 15 y 16) por lo que los microorganismos de este grupo funcional probablemente están inactivos o en muy bajo número en las muestras de suelo bajo las condiciones originales del sitio de estudio.

Estos resultados sugieren que, con respecto a las actividades relacionadas con el ciclo del nitrógeno, hubo una resiliencia completa dentro de la primera semana luego de la aplicación de los tratamientos a los microcosmos (Figura 15). Este hallazgo concuerda con observaciones previas en que la mayor parte de las actividades microbianas fueron capaces de recuperarse por completo después de un estrés transitorio. Sobre la base de mediciones del cociente respiratorio del suelo, Anan'eva y col. (2002) observó completa resiliencia en

suelos secos y rehidratados dentro de los primeros 7 días. Por otra parte, después de un estrés térmico, la descomposición a corto plazo de residuos agrícolas reveló resiliencia dentro de 13 días (Griffiths y col. 2001).

Por lo tanto, fluctuaciones en el contenido hídrico del suelo y la precipitación de N_r ácido podrían incrementar sustancialmente las pérdidas de nitrógeno desde los suelos, especialmente en estos ecosistemas semiáridos. La tasa aumentada de nitrificación puede producir acidificación, incremento en la lixiviación de nitrógeno como NO₃⁻ y aumento de las pérdidas gaseosas de nitrógeno por nitrificación o desnitrificación. Los ecosistemas áridos se caracterizan por frecuentes períodos de sequía, temperaturas extremas diarias y estacionales, bajo contenido de materia orgánica y baja reserva de nutrientes (Skūjins 1981; Lal 2001), llevando a pensar que estos suelos no son consumidores o productores significativos de gases traza. Como resultado, estos suelos fueron subestimados en los inventarios de los gases de efecto invernadero (Bowden 1986; Potter y col. 1996). Sin embargo, éste y otros trabajos sugieren que al menos los suelos semiáridos no pueden ser descartados en estudios que estimen el impacto de los ecosistemas terrestres sobre los cambios globales actuales y futuros (McLain & Martens 2006a).

4.3. EFECTO DE LA PRECIPITACIÓN ÁCIDA DE NITRÓGENO REACTIVO SOBRE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y METABÓLICA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA

Algunos antecedentes indican que existen 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 & Stotzky 1983; Prescott &

Parkinson 1985; Pennanen y col. 1998). Sin embargo, hay escasos antecedentes sobre la composición y estructura de las comunidades bacterianas que habitan en suelos áridos y cómo se afectan por un ingreso de Nr ácido (Adams 2003).

Tanto la diversidad genética de la comunidad bacteriana (Figura 17) como la diversidad metabólica de la microbiota de ambos suelos (Figuras 21 y 22) no mostraron cambios significativos por los tratamientos aplicados. Para el grupo funcional de oxidadores de amonio, sólo se detectaron cambios menores en cuanto a la diversidad genética (Figura 18). Los oxidadores de amonio comprenden sólo una sub-fracción de la comunidad total del suelo (Bothe y col. 2000; Silyn-Roberts & Lewis 2001). Consecuentemente, cambios dentro de este grupo funcional están supuestamente ocultos por una comunidad bacteriana total generalmente estable (Figura 17).

Algunos autores indicaron que la concentración de amonio, la concentración de oxígeno y el pH serían los parámetros ambientales que más afectan la actividad y diversidad de las poblaciones de nitrificadores (Princic y col. 1998). De acuerdo a los resultados de este trabajo, la adición de amonio no parece tener mayor efecto en la abundancia de las bacterias oxidadoras de amonio de acuerdo a los patrones de TRFLP, aunque se observó una tendencia a que muestras de suelo tratadas con Nr se agruparan juntas (Figura 19). Esta relativa ausencia de efecto sugiere que los microcosmos estarían respondiendo a otros parámetros ambientales como a cambios en el contenido hídrico, más que a la adición de amonio. Observaciones similares fueron hechas por Horz y col. (2004) al detectar que los oxidadores de amonio respondieron a un aumento moderado de la humedad del suelo al reducir el estrés hídrico. Trabajos anteriores de microcosmos para el estudio de este grupo

dieron cuenta de una limitación del crecimiento poblacional en respuesta a una disminución de pH del suelo durante la incubación (Okano y col. 2004).

Estudios previos de la composición de bacterias oxidadoras de amonio en suelo mostraron que modificaciones en el hábitat afectan principalmente la abundancia del gremio más que su composición (Mendum y col. 1999; Avrahami y col. 2002; Webster y col. 2002; Briones y col. 2003). Avrahami y col. (2002) concluyeron que la ausencia de cambios en la diversidad de nitrificadores del suelo luego de 4 semanas de tratamiento con diferentes concentraciones de amonio, se debió probablemente, a que estos organismos son de crecimiento lento (Kowalchuk & Stephen 2001). Mendum y col. (1999) arribaron a conclusiones similares luego de estudiar las poblaciones de oxidadores de amonio en suelos fertilizados y no fertilizados por un período de 6 semanas. Si bien la incubación en el presente trabajo fue de 12 semanas, se puede concluir igualmente que la respuesta de la actividad nitrificante fue probablemente debido a un cambio fisiológico más que a un cambio en la diversidad estructural de las poblaciones de oxidadores de amonio.

Marshall (1993) definió que uno de los objetivos principales de la ecología microbiana para entender el papel de los microorganismos en el ambiente, es comprender los procesos metabólicos que realizan éstos. Un acercamiento a esta problemática fue realizada mediante la determinación de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (Figuras 21 y 22). Los perfiles de utilización de fuentes de carbono se espera que detecten sólo cambios drásticos en la comunidad microbiana. Por el contrario, las técnicas moleculares tales como RFLP y TRFLP son capaces de detectar cambios a nivel de filotipos y así detectan probablemente cambios menores en la comunidad (Kirk y col. 2004; Ramsey

y col. 2006; Singh y col. 2006). De acuerdo con esta conjetura, en este trabajo se detectó que el contenido de nitrato fue uno de los factores edáficos que determinaron el agrupamiento de las muestras de acuerdo al tipo de suelo cuando se analizó la diversidad del gen *amoA* (Figura 20), aunque no se identificó evidencia significativa de agrupamiento relacionada con el tratamiento aplicado. Por el contrario, cuando se analizaron los CLPP (Figuras 23 y 24), el agrupamiento de las muestras de cada suelo pareció estar más relacionado con el tiempo de incubación de los microcosmos que con los tratamientos aplicados.

No obstante, los métodos de TRFLP y CLPP acoplados con el análisis de CCA (Figuras 20 y 24, respectivamente) tuvieron suficiente resolución para detectar diferencias entre ambos tipos de suelo tanto a nivel genético como fisiológico. Así, se puede concluir que los efectos de los tratamientos sobre las comunidades bacterianas del suelo fueron menores que las diferencias entre los tipos de suelo, más aún los factores edáficos que, en ambos casos influenciaron estos agrupamientos fueron los mismos: el pH y la MO, los cuales permitieron la diferenciación de ambos suelos. Estos resultados son consistentes con otros estudios que muestran que el régimen de humedad puede influir sobre la estructura de las comunidades microbianas, pero que las diferencias entre tipos de suelo y hojarasca son a menudo mayores en magnitud que cualquier efecto de factores abióticos como la humedad (Lundquist y col. 1999; McLean & Huhta 2000; Wilkinson y col 2002; Guevara 2007). Hay varios factores que permiten explicar las diferencias entre las comunidades bacterianas de ambos suelos. Entre ellos, están las diferencias en las condiciones abióticas del suelo, tales como temperatura (Zogg y col. 1997) y humedad (Bossio & Scow 1998; Schimel y col. 1999; Wilkinson y col. 2002), las cuales se ha visto que influyen sobre la estructura de la

comunidad microbiana. Los suelos semiáridos son, en promedio, más fríos y húmedos que los suelos áridos debido a la sombra de la cobertura vegetal y a la cobertura por una capa de hojarasca (Parker & Muller 1982). La estructura de la comunidad microbiana también depende de la disponibilidad y calidad de la materia orgánica y el estado nutricional del suelo (Bossio y col. 1998; Øvreås & Torsvik 1998; Griffiths y col. 1999). El suelo semiárido tiene, además, significativamente más carbono y nitrógeno orgánicos que el suelo árido.

Hasta ahora hay relativamente poca investigación sobre los efectos de la deposición de Nr en ecosistemas áridos, menos aún considerando a los microorganismos como parte importante en el reciclamiento de nutrientes en estos sistemas (Adams 2003). En la literatura ecológica existen numerosos estudios de efectos del nitrógeno en la productividad de diversidad de pastizales (e.g. van Hecke y col. 1981; Tilman 1987; Bobbink 1991; Mamalos y col. 1995). Aunque los suelos áridos y semiáridos desempeñan un papel comparativamente pequeño en la dinámica global del nitrógeno, representan alrededor de un tercio de los hábitats terrestres (Meigs 1953) y pueden ser particularmente sensibles a los cambios ambientales a gran escala (Stursova y col. 2006).

CONCLUSIONES

- El suelo árido del desierto mostró mayor diversidad de filotipos bacterianos que el suelo del matorral semiárido. En ambos suelos los clones del gen *amoA* se agruparon dentro del grupo 3 de *Nitrosospira*, un grupo dominante en suelos con pH neutro y relativamente altas concentraciones de amonio. El suelo semiárido mostró una diversidad mayor para el gen *nirS* que para el gen *nirK*. En el suelo árido no se detectó la presencia de genes de desnitrificadores. Un importante número de secuencias de los diferentes marcadores analizados se agruparon separadas o sólo relacionadas a clones ambientales, sugiriendo que estos ambientes podrían estar colonizados por bacterias exclusivas de estos suelos.
- Los resultados de los ensayos de microcosmos indicaron cierto grado de estabilidad de la diversidad genética bacteriana del suelo frente a los tratamientos ensayados, los cuales afectaron principalmente la actividad metabólica de la microbiota, en particular la actividad de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno. La presencia activa de estos gremios bacterianos sugiere que pueden desempeñar un importante papel en el balance de nitrógeno de estas zonas áridas y semiáridas, especialmente bajo condiciones de mayor disponibilidad de agua.
- El tipo de suelo explicó la diferenciación de las comunidades microbianas a nivel genético y metabólico. Los factores edáficos que influenciaron los agrupamientos fueron el pH y la MO, parámetros que diferencian ambos tipos de suelo.

PROYECCIONES

La investigación realizada es relevante porque: i) el análisis a nivel de la microbiota es un enfoque novedoso para estudiar los efectos de la disponibilidad de agua y el ingreso ácido de Nr a los ecosistemas áridos, ii) permite establecer relaciones entre la diversidad microbiana y la función del ecosistema y iii) permite una aproximación a la diversidad microbiológica de suelos áridos y semiáridos, la cual puede ser un reservorio de recursos genéticos con nuevas propiedades metabólicas.

Los efectos del cambio global, sobre la calidad e intensidad de los pulsos de agua, y sobre un aumento en la asincronía de la disponibilidad de agua, probablemente tendrán efectos sobre los ciclos biogeoquímicos en ecosistemas limitados por agua (Austin y col. 2004). Por lo tanto, una comprensión integrada de los procesos biogeoquímicos y microbianos dependientes de agua en estos sistemas poco estudiados constituye un desafío. Por otro lado, el aumento de las emisiones antropogénicas de nitrógeno a la atmósfera, con consecuencias aún desconocidas para el ciclo biogeoquímico (Vitousek y col. 1997), podrían ser particularmente severas en estos ecosistemas donde el nitrógeno es considerado normalmente como limitante (Hooper & Johnson 1999; Ehleringer 2001).

Si aceptamos que la diversidad “genética funcional” refleja la diversidad potencial de determinada función ecológica que realizan los grupos de microorganismos, entonces esta diversidad tiene consecuencias para las funciones ecosistémicas y, por lo tanto, puede relacionarse con la estabilidad y resiliencia de los ecosistemas (Ward 2002). Esta afirmación

tiene particular importancia en los suelos de ecosistemas áridos y semiáridos que se supone tienen reducida actividad microbiana (Gallardo & Schlesinger 1992).

Por otra parte, los ecosistemas áridos son ambientes extremos que albergan una gran diversidad de microorganismos (Bhatnagar & Bhatnagar 2005), los cuales son una fuente de recursos genéticos dadas sus capacidades para resistir o tolerar condiciones extremas de sequedad, limitación de nutrientes, radiación y otras condiciones extremas (Rainey y col. 2005; Chanal y col. 2006; Drees y col. 2006). Nuevas secuencias y microorganismos podrán tener aplicaciones biotecnológicas o ayudar a dilucidar los mecanismos que subyacen a la evolución y adaptación microbiana a estos ambientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Aber JD, JM Melillo, KJ Nadelhoffer, J Pastor, RD Boone. 1991. Factors controlling nitrogen cycling and nitrogen saturation in northern temperate forest ecosystems. *Ecol Applic* 1:303-315.
- Adams MB. 2003. Ecological issues related to N deposition into natural ecosystems: research needs. *Environ Internat* 29:189-199.
- Adu JK, JM Oades. 1978. Physical factors influencing decomposition of organic materials in soil aggregates. *Soil Biol Biochem* 10:109-115.
- Akkermans ADL. 1998. Molecular tools for tracking microorganisms in the environment. *In: Subba Rao NS, YR Dommergues (Eds). Microbial Interactions in Agriculture and Forestry. Oxford & IBH Publishing Co, PVT. LTD. pp. 1-17.*
- Alfaro M, L Bravo, J Orlando, M. Carú. 2006. Diversidad bacteriana del suelo y presencia de bacterias nitrificantes en el desierto de Atacama. Presentado en la XV Reunión Anual de la Sociedad de Ecología de Chile, La Serena, Chile, 27-29 de julio de 2006. pp. 81.
- Amann RI, W Ludwig, KH Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169.
- Anan'eva ND, EV Blagodatskaya, TS Demkina. 2002. Estimating the resistance of soil microbial complexes to natural and anthropogenic impacts. *Eurasian Soil Sci* 35:514-521.
- Appel T. 1998. Non-biomass soil organic N: the substrate for N mineralization flushes following soil drying-rewetting and for organic N rendered CaCl₂-extractable upon soil drying. *Soil Biol Biochem* 30:1445-1456.
- Asman WAH, MA Sutton, JK Schjoerring. 1998. Ammonia: emission, atmospheric transport and deposition. *New Phytol* 139:27-48.
- Atlas RM, R Bartha. 2001. *Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4º Edición. Addison Wesley, Madrid.*
- Austin AT, L. Yahdjian, JM Stark, J Belnap, A Porporato, U Norton, DA Ravetta, SM Schaeffer. 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141:221-235.
- Avrahami S, R Conrad, G Braker. 2002. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Appl Environ*

- Microbiol 68:5685-5692.
- Bardgett RD, WD Bowman, R Kaufmann, SK Schmidt. 2005. Linking aboveground and belowground ecology: a temporal approach. *Trends Ecol Evol* 20:634-641.
- Becker JM, T Parkin, CH Nakatsu, JD Wilbur, A Konopka. 2006. Bacterial activity, community structure, and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil. *Microb Ecol* 51:220-231.
- Begon M, JL Harper, CR Townsend. 1990. *Ecology. Individuals, populations and communities*. 2^o Edition. Blackwell Scientific Publications Inc, Cambridge.
- Beiderbeck VO, CA Campbell, H Ukrainetz, D Curtin, OT Bouman. 1996. Soil microbial and biochemical properties after ten years of fertilization with anhydrous ammonia. *Can J Soil Sci* 76:7-14.
- Belnap J, D Eldridge. 2003. Disturbance and recovery of biological soil crusts. *In: Belnap J, OL Lange (Eds). Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. 1^o Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 365-383.
- Belnap J, SL Phillips, ME Miller. 2004. Response of desert biological soil crusts to alterations in precipitation frequency. *Oecologia* 141:306-316.
- Bewley RJ, G Stotzky. 1983. Effects of combinations of simulated acid rain and cadmium or zinc on microbial activity in soil. *Environ Res* 31:332-339.
- Bhatnagar A, M Bhatnagar. 2005. Microbial diversity in desert ecosystems. *Curr Sci* 89:91-100.
- Binkley D, C Giardina. 1997. Nitrogen fixation in tropical forest plantations. Chapter 9. *In: Nambiar E, A Brown (Eds). Management of soil, nutrients and water in tropical plantation forests*. ACIAR/CSIRO/CIFOR Monograph No. 43, Canberra, Australia.
- Birch H. 1958. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant Soil* 10:9-31.
- Borneman J, EW Triplett. 1997. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* 63:2647-2653.
- Bossio DA, KM Scow. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb Ecol* 35:265-278.
- Bothe H, G Jost, M Schloter, BB Ward, 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}C and ^{15}N -labelled plant material. *Soil Biol Biochem* 17:329-337.
- Bowden WB. 1986. Gaseous nitrogen emissions from undisturbed terrestrial ecosystems - An assessment of their impacts on local and global nitrogen budgets. *Biogeochemistry* 2:249-279.
- Bobbink R. 1991. Effects of nutrient enrichment in Dutch chalk grassland. *J Appl Ecol* 28:28-41.
- Bossio DA, Scow KM. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb Ecol* 35:265-278.
- Braker G, A Fesefeldt, KP Witzel. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64:3769-3775.
- Braker G, HL Ayala-del-Río, AH Devol, A Fesefeldt, 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.
- Braker G, J Zhou, L Wu, AH Devol, JM Tiedje. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol* 66:2096-2104.
- Briones AM, S Okabe, Y Umehiya, NB Ramsing, W Reichardt, H Okuyama. 2003. Ammonia-oxidizing bacteria on root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different rice cultivars. *Plant Soil* 250:335-348.
- Brown JH, TJ Valone, CG Curtin. 1997. Reorganization of an arid ecosystem in response to recent climate change. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9729-9733.
- Bruns MA, JR Stephen, GA Kowalchuk, JL Prosser, EA Paul. 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Appl Environ Microbiol* 65:2994-3000.
- Büdel B. 2003. Biological soil crusts of south America. *In*: Belnap J, OL Lange (Eds). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. 1^o Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 51-55.

- Cable JM, TE Huxman. 2004. Precipitation pulse size effects on Sonoran Desert soil microbial crusts. *Oecologia* 141:317-324.
- Carú M, G Mosquera, L Bravo, G Guevara, D Sepúlveda, A Cabello. 2003. Infectivity and effectivity of *Frankia* strains from the Rhamnaceae family on different actinorrhizal plants. *Plant Soil* 251:219-225.
- Casciotti KL, BB Ward. 2001. Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67:2213-2221.
- 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>
- Chanal A, V Chapon, K Benzerara, M Barakat, R Christen, W Achouak, F Barras, T Heulin. 2006. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environ Microbiol* 8:514-525.
- Chapuis-Lardy L, N Wrage, A Metay, JL Chotte, M Bernoux. 2007. Soils, a sink for N₂O? A review. *Glob Change Biol* 13:1-17.
- Charney J, PH Stone, WJ Quirk. 1975. Drought in the Sahara: A biogeophysical feedback mechanism. *Science* 187:434-435.
- Chávez M, Carú M. 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.
- Chávez M. 2004. Diversidad genética de las poblaciones de *Frankia* y bacterias fijadoras de nitrógeno en la rizosfera de *Colletia hystrix*. Tesis de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 145 pp.
- Cho JC, JM Tiedje. 2002. Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* 68:1425-1430.
- Cooke RC, ADM Rayner. 1984. Ecology of Saprotrophic Fungi. Longman, London and New York.
- Córdova-Kreylos AL, Y Cao, PG Green, HM Hwang, KM Kuivila, MG Lamontagne, LC Van De Werfhorst, PA Holden, KM Scow. 2006. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. *Appl Environ Microbiol* 72:3357-3366.
- Cui M, Caldwell M. 1997. A large ephemeral release of nitrogen upon wetting of dry soil and corresponding root responses in the field. *Plant Soil* 191:291-299.

- Dandie CE, MN Miller, DL Burton, BJ Zebarth, JT Trevors, C Goyer. 2007. Nitric oxide reductase-targeted real-time PCR quantification of denitrifier populations in soil. *Appl Environ Microbiol* 73:4250-4258.
- Davidson E, J Stark, M Firestone. 1990. Microbial production and consumption of nitrate in an annual grassland. *Ecology* 71:1968-1975.
- Davidson EA, PA Matson, PM Vitousek, R Riley, K Dunkin, G Garcia-Mendez, JM Maass. 1993. Processes regulating soil emissions of NO and N₂O in a seasonally dry tropical forest. *Ecology* 74:130-139.
- De Boer W, GA Kowalchuk. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol Biochem* 33:853-866.
- Degens BP, 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.
- De Vries W, A Breeuwsma. 1987. The relation between soil acidification and element cycling. *Water Air Soil Poll* 35:293-310.
- Drees KP, JW Neilson, JL Betancourt, J Quade, DA Henderson, BM Pryor, RM Maier. 2006. Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama desert, Chile. *Appl Environ Microbiol* 72: 7902-7908.
- Driscoll CT, GB Lawrence, AJ Bulger, TJ Butler, CS Cronan, C Eagar, KF Lambert, GE Likens, JL Stoddard, KC Weathers. 2001. Acid Rain Revisited: advances in scientific understanding since the passage of the 1970 and 1990 Clean Air Act Amendments. Hubbard Brook Research Foundation. Science Links™ Publication. Vol. 1, no.1.
- Dunbar J, S Takala, SM Barns, JA Davis, CR Kuske. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol* 65:1662-1669.
- Dunbar J, LO Ticknor, CR Kuske. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16SrRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 67:190-197.
- Dunbar J, SM Barns, LO Ticknor, CR Kuske. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl Environ Microbiol* 68:3035-3045.
- Ehleringer JR. 2001. Productivity of deserts. *In*: Mooney HA, J Roy (Eds). Primary productivity in terrestrial ecosystems. Academic Press, San Diego. pp 345-362.
- Enwall K, L Philippot, S Hallin. 2005. Activity and composition of the denitrifying bacterial

community respond differently to long-term fertilization. *Appl Environ Microbiol* 71:8335-8343.

Erickson HE, P Soto, DW Johnson, B Roath, C Hunsaker. 2005. Effects of vegetation patches on soil nutrient pools and fluxes within a mixed-conifer forest. *Forest Sci* 51:211-220.

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

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

Farías F. 2006. Efectos de la rizósfera de *Colletia hystrix* sobre la comunidad bacteriana del suelo. Memoria de Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 49 pp.

Fenn ME, R Haeuber, GS Tonnesen, JS Baron, S Grossman-Clarke, D Hope, DA Jaffe, S Copeland, L Geiser, HM Rueth, JO Sickman. 2003. Nitrogen emissions, deposition and monitoring in the western United States. *BioScience* 53:391-403.

Fierer N, JP Schimel. 2002. Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biol Biochem* 34:777-787.

Fierer N, JA Jackson, R. Vilgalys, RB Jackson. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 71:4117-4120.

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

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.*

Franzluebbers AJ, JA Stuedemann, HH Schomberg. 2000. Spatial distribution of soil carbon and nitrogen pools under grazed tall fescue. *Soil Sci Soc Am J* 64:635-639.

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

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

- Galloway JN, EB Cowling, SP Seitzinger, RH Socolow. 2002. Reactive nitrogen: too much of a good thing?. *Ambio* 31:60-63.
- Galloway JN, JD Aber, JW Erisman, SP Seitzinger, RW Howarth, EB Cowling, and JB Cosby. 2003. The nitrogen cascade. *Bioscience* 53:341-356.
- Galloway JN. 1995. Acid deposition: Perspectives in time ad space. *Wat Air Soil Poll* 85:15-24.
- Galloway JN. 1998. The global nitrogen cycle: Changes and consequences. *Environ Poll* 102:15-24.
- Garland JL. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 24:289-300.
- Gebauer RLE, JR Ehleringer. 2000. Water and nitrogen uptake patterns following moisture pulses in a cold desert community. *Ecology* 81:1415-1424.
- Gillett JW, JM Witt. 1980. Chemical evaluation: projected application of terrestrial microcosm technology. *In: Giesy JP (Ed). Microcosms in Ecological Research, US Dept. of Energy.* pp. 1008-1033.
- Gillett JW. 1989. Terrestrial microcosms and mesocosms in ecotoxicologic research. *In: Levin SA (Ed). Ecotoxicology: Problems and Approaches, Berlin: Springer-Verlag.* pp. 280-313.
- Girvan MS, J Bullimore, JN Pretty, AM Osborn, 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.
- Glatzel S, K Stahr. 2001. Methane and nitrous oxide exchange in differently fertilised grassland in southern Germany. *Plant Soil* 231:21-35.
- Godoy R, J Haneke, J Staelens, C Oyarzún, L Paulino, M Barrientos. 2005. Dry deposition of nitrogen to passive samplers in grassland and forest canopies in the Central depression of southern Chile. *Gayana Bot* 62:110-119.
- Goulding KWT, NJ Bailey, NJ Bradbury, P Hargreaves, M Howe, DV Murphy, PR Poulton, TW Willison. 1998. Nitrogen deposition and its contribution to nitrogen cycling and associated soil processes. *New Phytol* 139:49-58.
- Griffiths B, K Ritz, N Ebbelwhite, G Dobson. 1999. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem* 31:145-153.
- Griffiths BS, M Bonkowski, J Roy, K Ritz. 2001. Functional stability, substrate utilization

and biological indicators of soils following environmental impacts. *Appl Soil Ecol* 16:49-61.

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

Grüntzing V, SC Nold, J Zhou, JM Tiedje. 2001. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 67:760-768.

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

Hackl E, S Zechmeister-Boltenstern, L Bodrossy, 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 Symp Ser* 41:95-98.

Halverson LJ, TM Jones, MK Firestone. 2000. Release of intracellular solutes by four soil bacteria exposed to dilution stress. *Soil Sci Soc Am J* 64:1630-1637.

Henry S, D Bru, B Stres, S Hallet, L Philippot. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl Environ Microbiol* 72:5181-5189.

Hiorns WD, RC Hastings, IM Head, AJ McCarthy, JR Saunders, RW Pickup, GH Hall. 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrospiras in the environment. *Microbiology* 141:2793-2800.

Holmes AJ, J Bowyer, MP Holley, M O'Donoghue, M Montgomery, MR Gillings. 2002. Diverse, yet-to-be-cultured members of the Rubrobacter subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiol Ecol* 33:111-120.

Hood GM. 2000. PopTools: software for the analysis of ecological models. <http://www.cse.csiro.au/poptools/>

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

Horz HP, A Barbrook, CB Field, 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, J Belnap. 2006. Carbon and nitrogen fixation differ between successional stages of biological soil crusts in the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *J Arid Environ.* 66:620-634.
- Hugenholtz P, NR Pace. 1996. Identifying microbial diversity in the natural environments: a molecular phylogenetic approach. *TIBTECH* 14:190-197.
- Ives AR, SR Carpenter. 2007. Stability and Diversity of Ecosystems. *Science* 317:58-62.
- Janssen PH. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Minireviews. Appl Environ Microbiol* 72:1719-1728.
- Johnson DW. 1995. Soil properties beneath *Ceanothus* and pine stands in the eastern Sierra Nevada. *Soil Sci Soc Am J* 59:918-924.
- Johnson SL, CR Budinoff, J Belnap, F Garcia-Pichel. 2005. Relevance of ammonium oxidation within biological soil crust communities. *Environ Microbiol* 7:1-12.
- Jukes TH, CR Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. *In: Munro HM (Ed). Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, N.Y. pp 21-132.*
- Kandeler E, K Deiglmayr, D Tschirko, D Bru, L Philippot. 2006. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Appl Environ Microbiol* 72:5957-5962.
- Kieft TL, CS White, SR Loftin, R Aguilar, JA Craig, DA Skaar. 1998. Temporal dynamics in soil carbon and nitrogen resources at a grassland–shrubland ecotone. *Ecology* 79:671-683.
- 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.
- Kieft TL. 2002. Hot desert soil communities. *Encyclopedia of environmental microbiology.* Wiley, New York.
- Kirk JL, LA Beaudette, M Hart, P Moutoglis, JN Klironomos, H Lee, JT Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 58:169-188.
- Klepac-Ceraj V, I Ceraj, MF Polz. 2006. Clusterer: extendable java application for sequence grouping and cluster analyses. *Online J Bioinform* 7:15-21.
- Koutrakis P, SN Sax, JA Sarnat, B Coul, P Demokritou, P Oyola, J García, E Gramsch. 2005. Analysis of PM₁₀, PM_{2.5} and PM_{2.5-10} concentrations in Santiago, Chile from 1989 to 2001. *J Air Waste Manage Assoc* 55:342-351.

- Kowalchuk GA, AW Stienstra, GHJ Heilig, JR Stephen, JW Woldendorp. 2000. Composition of communities of ammonium-oxidising bacteria in wet, slightly acid grassland soils using 16S rDNA-analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 31:207-215.
- Kowalchuk GA, JR Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 55:485-529.
- Kramer SB, JP Reganold, JD Glover, BJM Bohannan, HA Mooney. 2006. Reduced nitrate leaching and enhanced denitrifier activity and efficiency in organically fertilized soils. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4522-4527.
- Kuske CR, SM Barns, JD Busch. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol* 63:3614-3621.
- Kuske CR, LO Ticknor, ME Miller, JM Dunbar, JA Davis, SM Barns, J Belnap. 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in arid grassland. *Appl Environ Microbiol* 68:1854-1863.
- Lal R. 2001. Potential of desertification control to sequester carbon and mitigate the greenhouse effect. *Clim Change* 51:35-72.
- Lamers LPM, MES Van Roozendaal, JGM Roelofs. 1998. Acidification of freshwater wetlands: combined effects of non-airborne sulfur pollution and desiccation. *Wat Air Soil Poll* 105:95-106.
- Lester ED, M Satomi, A Ponce. 2007. Microflora of extreme arid Atacama Desert soils. *Soil Biol Biochem* 39:704-708.
- Li WT. 1981. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1085-1089.
- Lieth H. 1975. Modeling the primary productivity of the world. *In*: Lieth H, RH Whittaker (Eds). *Primary productivity of the biosphere*, vol 14. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 237-263.
- Lipson DA, RF Wilson, WC Oechel. 2005. Effects of elevated atmospheric CO₂ on soil microbial biomass, activity, and diversity in a chaparral ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 71:8573-8580.
- Lundquist E, K Scow, L Jackson, S Uesugi, C Johnson. 1999. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input and organic farming systems to a wet/dry cycle. *Soil Biol Biochem* 31:1661-1675.
- Mabuhay JA, Y Isagi, N Nakagoshi. 2004. Microbial biomass, abundance and community

- diversity determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis in soil at varying periods after occurrence of forest fire. *Microbes Environ* 19:154-162.
- Madigan M, J Martinko, J Parker. 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8th edition. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Maier RM, KP Drees, JW Neilson, DA Henderson, J Quade, JL Betancourt. 2004. Microbial life in the Atacama Desert. *Science* 306:1289-1290.
- Mamalos AP, DS Veresoglou, N Barbayiannis. 1995. Plant species abundance and tissue concentrations of limiting nutrients in low-nutrient grasslands: a test of competition theory. *J Ecol* 83:485-495.
- Manly BFJ. 1994. *Multivariate statistical methods*. 2nd edition. Chapman & Hall, London.
- Marilley L, 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.
- Marshall KC. 1993. Microbial ecology: whither goest thou? *In*: Guerrero R, C Pedros-Alio (Eds). *Trends in Microbial Ecology*. Spanish Society for Microbiology, Barcelona, España. pp. 5-8.
- McCann KS. 2000. The diversity-stability debate. *Nature* 405:228-233.
- 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.
- McCully ME. 1999. Roots in soil: unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:695-718.
- McKay CP, EI Friedmann, B Gomez-Silva, L Caceres-Villanueva, DT Andersen, R Landheim. 2003. Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: four years of observations including the El Niño of 1997-1998. *Astrobiology* 3:393-406.
- McLain JET, DA Martens. 2006a. Nitrous oxide flux from amino acid mineralization. *Soil Biol Biochem* 37:289-299.
- McLain JET, DA Martens. 2006b. N₂O production by heterotrophic N transformations in a semiarid soil. *Appl Soil Ecol* 32:253-263.
- McLean MA, V Huhta. 2000. Temporal and spatial fluctuations in moisture affect humus microfungus community structure in microcosms. *Biol Fert Soils* 32:114-119.

- Mendum TA, RE Sockett, PR Hirsch. 1999. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the beta subdivision of the class proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. *Appl Environ Microbiol* 65:4155-4162.
- Meigs P. 1953. World distribution of arid and semi-arid homoclimates. *In: UNESCO Arid Zone Res. Series N°1, Arid Zone Hydrology. UNESCO.* pp. 203-209.
- Meyer O. 1994. Functional groups of microorganisms. *In: Shulze, Mooney (Eds). Biodiversity and Ecosystem Function. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.* pp 67-96.
- Michotey V, V Mejean, P Bonin. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in marine samples. *Appl Environ Microbiol* 66:1564-1571.
- Morales R, M Leiva. 2006. Distribución y concentraciones críticas de material particulado en la ciudad de Santiago. *En: Morales R (Ed). Contaminación atmosférica urbana. Episodios críticos de contaminación ambiental en la ciudad de Santiago. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.* pp. 106-110.
- Nagy ML, A Perez, F Garcia-Pichel. 2005. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert. *FEMS Microbiol Ecol* 54:233-245.
- Navarro-González R, FA Rainey, P Molina, DR Bagaley, BJ Hollen, J de la Rosa, AM Small, RC Quinn, FJ Grunthaner, L Cáceres, B Gomez-Silva, CP McKay. 2003. Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. *Science* 302:1018-1021.
- Nejidat A. 2005. Nitrification and occurrence of salt-tolerant nitrifying bacteria in the Negev desert soils. *FEMS Microbiol Ecol* 52:21-29.
- Nelson, DW. 1983. Determination of ammonium in KCl extracts by the salicylate Method. *Commun. Soil Sci Plant Anal* 14:1051-1062.
- Nicolaisen M, N Ramsing. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J Microb Meth* 50:189-203.
- Norton JM, JJ Alzerreca, Y Suwa, MG Klotz. 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol* 177:139-149.
- Noy-Meir I. 1973. Desert ecosystems: environment and producers. *Annu Rev Ecol Syst* 4:25-52.
- OIES. Office for Interdisciplinary Earth Studies. 1991. Arid ecosystems interactions:

recommendations for drylands research in the global change research program. OIES-Report 6: 81.

Okano Y, KR Hristova, CM Leutenegger, LE Jackson, RF Denison, B Gebreyesus, D Lebauer, KM Scow. 2004. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol* 70:1008-1016.

Orlando J, M Chávez, L Bravo, R Guevara, M Carú. 2007a. Effect of *Colletia hystrix* (Clos), a pioneer actinorhizal plant from the Chilean matorral, on the genetic and potential metabolic diversity of the soil bacterial community. *Soil Biol Biochem* doi: 10.1016/j.soilbio.2007.05.024.

Orlando, J.; Braker, G; Carú, M. 2007b. Composición de las bacterias desnitrificadoras en el suelo del matorral esclerófilo de Chile Central. *Biological Research* 40(A):R114.

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

Øvreås L, V Torsvik. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb Ecol* 36:303-315.

Oyarzún CE, R Godoy, S Leiva. 2002. Depositación atmosférica de nitrógeno en un transecto valle longitudinal-cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. *Rev Chil Hist Nat* 75:233-243.

Parker V, C Muller. 1982. Vegetational and environmental changes beneath isolated live oak trees (*Quercus agrifolia*) in a California annual grassland. *Am Mid Nat* 107:69-81.

Potter CS, EA Davidson, LV Verchot. 1996. Estimation of global biogeochemical controls and seasonality in soil methane consumption. *Chemosphere* 32:2219-2246.

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

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

Phillips CJ, D Harris, SL Dollhopf, KL Gross, JI Prosser, EA Paul. 2000. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Appl Environ Microbiol* 66:5410-5418.

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

- Priemé A, G Braker, JM Tiedje. 2002. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl Environ Microbiol* 68:1893-1900.
- Princic A, I Mahne, F Megusar, EA Paul, JM Tiedje. 1998. Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Appl Environ Microbiol* 64:3584-3590.
- Prosser JI. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv Microbiol Physiol* 30:125-181.
- Prosser JI, TM Embley, G Webster. 2003. The influence of selection pressures on species diversity, functional gene diversity and activity of ammonia-oxidizing bacteria. *In: Hails RS, JE Beringer, HCJ Godfray (Eds). Genes in the environment. Blackwell Publishing, Oxford. pp. 187-202.*
- Pulleman M, A Tietema. 1999. Microbial C and N transformations during drying and rewetting of coniferous forest floor material. *Soil Biol Biochem* 31:275-285.
- Purkhold U, A Pommerening-Roser, S Juretschko, MC Schmid, HP Koops, M Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol* 66:5368-5382.
- 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.
- Querol X, A Alastuey, S Rodríguez, F Plana, E Mantilla, C Ruiz. 2001. Monitoring of PM10 and PM2.5 around primary particulate anthropogenic emission sources. *Atmos Environ* 35:845-858.
- Rainey FA, K Ray, M Ferreira, BZ Gatz, MF Nobre, D Bagaley, BA Rash, MJ Park, AM Earl, NC Shank, AM Small, MC Henk, JR Battista, P Kampfer, MS da Costa. 2005. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Appl Environ Microbiol* 71:5225-5235.
- Ramsey PW, MC Rillig, KP Feris, WE Holben, 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.
- Ranjard L, F Poly, JC Lata, C Mougel, J Thioulouse, S Nazaret. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl Environ Microbiol* 67:4479-4487.

- Rösch C, A Mergel, H Bothe. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microbiol* 68:3818-3829.
- Rotthauwe JH, KP Witzel, W Liesack. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63:4704-4712.
- Ryan MG, P O'Toole, EP Farrell. 1998. The influence of drought and natural rewetting on nitrogen dynamics in a coniferous ecosystem in Ireland. *Environ Pollut* 102:445-451.
- Saitou N, M Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Sala OE, WJ Parton, LA Joyce, WK Lauenroth. 1988. Primary production of the central grassland region of the United States. *Ecology* 69:40-45.
- 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, DH Wall. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1770-1776.
- Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santoro AE, AB Boehm, CA Francis. 2006. Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Appl Environ Microbiol* 72:2102-2109.
- Scheu S, D Parkinson. 1994. Changes in bacterial and fungal biomass C, bacterial and fungal biovolume and ergosterol content after drying, remoistening and incubation of different layers of cool temperate forest soils. *Soil Biol Biochem* 26:1515-1525.
- Schimel DS, WJ Parton. 1986. Microclimatic controls of nitrogen mineralization and nitrification in shortgrass steppe soils. *Plant Soil* 93:347-357.
- Schimel JP, JM Gullledge, JS Clein-Curley, JE Lindstrom, JF Braddock. 1999. Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. *Soil Biol Biochem* 31:831-838.
- Schimel J. 2004. Playing scales in the methane cycle: from microbial ecology to globe. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12583-12587.
- Schlesinger W. 1997. *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*. Academic Press Inc. London.
- Schlesinger WH, JA Raikes, AE Hartley, AF Cross. 1996. On the spatial pattern of soil

- nutrients in desert ecosystems. *Ecology* 77:364-374.
- Scholes MC, R Martin, RJ Scholes, D Parsons, E Winstead. 1997. NO and N₂O emissions from savanna soils following the first simulated rains of the season. *Nutr Cycl Agroecosyst* 48:115-122.
- Schwinning S, BI Starr, NJ Wojcik, ME Miller, JE Ehleringer, RL Sanford Jr. 2005. Effects of nitrogen deposition on an arid grassland in the Colorado Plateau cold desert. *Rangeland Ecol Manage* 58:565-574.
- Seneviratne R, A Wild. 1985. Effect of mild drying on the mineralization of soil nitrogen. *Plant Soil* 84:175-179.
- Sharma S, A Rangger, M von Lützow, H Insam. 1998. Functional diversity of soil bacterial communities increases after maize litter amendment. *Eur J Soil Biol* 34:53-60.
- Sharma S, MK Aneja, J Mayer, JC Munch, M Schloter. 2005. Diversity of Transcripts of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) in Rhizospheres of Grain Legumes. *Appl Environ Microbiol* 71:2001-2007.
- Singh BK, S Munro, E Reid, B Ord, JM Potts, E Paterson, P Millard. 2006. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *Eur J Soil Sci* 57:72-82.
- Silyn-Roberts G, G Lewis. 2001. In situ analysis of *Nitrosomonas* spp. in wastewater treatment wetland biofilms. *Wat Res* 35:2731-2739.
- Singh JS, AK Kashyap. 2006. Dynamics of viable nitrifier community, N-mineralization and nitrification in seasonally dry tropical forests and savanna. *Microbiol Res* 161:169-179.
- Skütjins J. 1981. Nitrogen cycling in arid ecosystems. *In*: Clark FE, T Rosswall (Eds). *Terrestrial nitrogen cycles*. *Ecology Bull* 33:477-491.
- Smith MS, JM Tiedje. 1979. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. *Soil Biol Biochem* 11:261-267.
- Sneath PHA, RR Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- Sorensen L. 1974. Rate of decomposition of organic matter in soil as influenced by repeated air drying-rewetting and repeated additions of organic material. *Soil Biol Biochem* 6:287-292.
- Stephen JR, AE McCaig, Z Smith, JI Prosser, TM Embley. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to b-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62:4147-4154.

- Stephen JR, GA Kowalchuk, MAV Bruns, AE McCaig, CJ Phillips, TM Embley, JI Prosser. 1998. Analysis of β -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. *Appl Environ Microbiol* 64:2958-2965.
- Steubing L, R Godoy, M Alberdi. 2002. *Métodos de Ecología Vegetal*. 1° Edición. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Stevens CJ, NB Dise, O Mountford, DJ Gowing. 2004. Impact of Nitrogen Deposition on the Species Richness of Grasslands. *Science* 303:1876-1879.
- Stursova M, CL Crenshaw, RL Sinsabaugh. 2006. Microbial responses to long-term N deposition in a semiarid grassland. *Microb Ecol* 51:90-98.
- Ter Braak C, P Smilauer. 1998. Canoco reference manual and user's guide to Canoco for Windows: software for canonical community ordination (version 4). *In*: Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA. pp. 352.
- Ter Braak, CJF. 1990. Update notes: CANOCO version 3.10. Agricultural Mathematics Group, Wageningen.
- Throbäck IN, K Enwall, Å Jarvis, S Hallin. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *NosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* 49:401-417.
- Tilman D. 1987. Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients. *Ecol Monogr* 57:189-214.
- Torsvik V, L Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5:240-245.
- van Breemen N, PA Burrough, EJ Velthorst, HF van Dobben, T De Wit, TB Ridder, HFR Reijnders. 1983. Soil acidification from atmospheric ammonium sulphate in forest canopy throughfall. *Nature* 299:548-550.
- van Breemen N, HFG Van Dijk. 1988. Ecosystem effects of atmospheric deposition of nitrogen in the Netherlands. *Environ Pollut* 54:249-274.
- Van de Peer Y, R De Wachter. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Applic Biosci* 10:569-570.
- van Gestel M, R Merckx, K Vlassak. 1993. Microbial biomass responses to soil drying and rewetting: the fate of fast- and slow-growing microorganisms in soils from different climates. *Soil Biol Biochem* 25:109-123.

- van Hecke P, I Impens, TJ Behaeghe. 1981. Temporal variation of species composition and species diversity in permanent grassland plots with different fertilizer treatments. *Vegetatio* 47:221-232.
- Vitousek PM, DU Hooper. 1994. Biological diversity and terrestrial ecosystem biogeochemistry. *In*: Shulze, Mooney (Eds). *Biodiversity and Ecosystem Function*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 3-14.
- Vitousek PM, JD Aber, RW Howarth, GE Likens, PA Matson, DW Schindler, WH Schlesinger, DG Tilman. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Iss Ecol* 1:1-15.
- Vourlitis GL, G Zorba, SC Pasquini, R Mustard. 2007. Chronic nitrogen deposition enhances nitrogen mineralization potential of semiarid shrubland soils. *Soil Sci Soc Am J* 71:836-842.
- Waldrop M, M Firestone. 2006. Seasonal dynamics of microbial community composition and function in oak canopy and open grassland soils. *Microb Ecol* 52:470-479.
- Ward BB. 2002. How many species of prokaryotes are there?. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10234-10236.
- Webb W, S Szarek, W Lauenroth, R Kinerson. 1978. Primary productivity and water use in native forest, grassland, and desert ecosystems. *Ecology* 59:1239-1247.
- Webster G, TM Embley, JI Prosser. 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of β -proteobacteria ammonia oxidizer populations. *Appl Environ Microbiol* 68:20-30.
- Weisburg WG, SM Barns, DA Pelletier, DJ Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697-703.
- Whitby CB JR Saunders, RW Pickup, AJ McCarthy. 2001. A comparison of ammonia-oxidiser populations in eutrophic basins of large freshwater lake. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 79:179-188.
- Wilkinson S, J Anderson, S Scardelis, M Tisiafouli, A Taylor, V Wolters. 2002. PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. *Soil Biol Biochem* 34:189-200.
- Wolters V, WL Silver, DE Bignell, DC Coleman, P Lavelle, WH van der Putten, P de Ruiter, J Rusek, DH Wall, DA Wardle, L Brussaard, JM Dangerfield, VK Brown, K Giller, DU Hooper, O Sala, J Tiedje, JA van Veen. 2000. Effects of global changes on above- and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: implications for ecosystem functioning. *BioScience* 50:1089-1098.

- Wu L, DK Thompson, G Li, RA Hurt, JM Tiedje, J Zhou. 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl Environ Microbiol* 67:5780-5790.
- Yannarell AC, EW Triplett. 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl Environ Microbiol* 71:227-239.
- Yang CH, DE Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl Environ Microbiol* 66:345-351.
- Yang JE, Skogley EO, Schaff BE, Kim JJ. 1998. Simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. *Soil Sci Soc Am J* 62:1108-1115.
- Ye RW, BA Averill, JM Tiedje. 1994. Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Appl Environ Microbiol* 60:1053-1058.
- Yeager CM, J Kornosky, DC Housman, EE Grote, J Belnap, CR Kuske. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Appl Environ Microbiol* 70:973-983.
- Yeager CM, DE Northup, CC Grow, SM Barns, CR Kuske. 2005. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl Environ Microbiol* 71:2713-2722.
- Zak DR, D Tilman, RR Parmenter, CW Rice, FM Fisher, J Vose, D Milchunas, CW Martin. 1994. Plant production and soil microorganisms in late-successional ecosystems: a continental-scale study. *Ecology* 75:2333-2347.
- Zhou J, B Xia, DS Treves, LY Wu, TL Marsh, RV O'Neill, AV Palumbo, 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 and heterogeneity in sandy subsurface soils. *Appl Environ Microbiol* 70:1723-1734.
- Zhou J, B Xia, H Huang, DS Treves, LJ Hauser, RJ Mural, AV Palumbo, JM Tiedje. 2003. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil Biol Biochem* 35:915-924.
- Zogg G, D Zak, D Ringelberg, N MacDonald, K Pregitzer, D White. 1997. Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Sci Soc Am J* 61:475-481.
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:533-616.

ANEXOS

Tabla A.1. Secuencias del rDNA 16S obtenidas mediante el programa Blast-n (NCBI) que presentaron mayor identidad con los clones procedentes de los suelos semiárido (M: matorral) y árido (D: desierto).

Clon	Phylum	Secuencia más relacionada	Nº acceso	Identidad	Fuente
M-16S-2	Acidobacteria	Uncultured bacterium clone FCPY750	EF516372	97%	Suelo de pastizales
M-16S-3	Bacteroidetes	Uncultured bacterium clone FFCH5846	EU133656	97%	Suelo de pradera
M-16S-4	Proteobacteria	Uncultured bacterium clone JPL1_70	DQ532142	98%	Laboratorio de propulsión
M-16S-5	Gemmatimonadetes	Bacterium Ellin5290	AY234641	95%	Suelo
M-16S-6	Acidobacteria	Uncultured bacterium clone cD28011	AJ617854	96%	Suelo de arrozales
M-16S-7	Acidobacteria	Uncultured Acidobacteria bacterium clone AKYG1760	AY921984	96%	Suelo agrícola
M-16S-8	Acidobacteria	Uncultured soil bacterium clone 529	AY493931	96%	Suelo
M-16S-9	Proteobacteria	Uncultured bacterium clone AKAU3693	DQ125646	99%	Suelo contaminado con uranio
M-16S-10	Proteobacteria	Uncultured bacterium clone FFCH1019	EU133308	98%	Suelo de pradera
M-16S-11	Bacteroidetes	Uncultured Sphingobacteria bacterium clone GASP-WA2W2_A02	EF072886	98%	Suelo de pastizales
M-16S-12	Acidobacteria	Uncultured bacterium clone FFCH10231	EU132322	97%	Suelo de pradera
M-16S-13	Verrucomicrobia	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Elev_16S_686	EF019437	96%	Rizósfera
M-16S-14	Actinobacteria	<i>Micromonospora</i> sp. 84521	DQ008604	98%	Suelo
M-16S-15	Firmicutes	Uncultured bacterium clone 21BSF51	AJ863231	98%	Suelo asociado a Álamos
M-16S-17	Acidobacteria	Uncultured bacterium clone FCPS449	EF516744	97%	Suelo de pastizales
M-16S-18	Actinobacteria	Uncultured bacterium clone FFCH12780	EU132784	96%	Suelo de pradera
M-16S-19	Actinobacteria	Uncultured bacterium clone FCPO657	EF516543	91%	Suelo de pastizales
M-16S-22	Actinobacteria	Bacterium Ellin6023	AY234675	97%	Suelo
M-16S-23	Verrucomicrobia	Uncultured bacterium clone FCPU588	EF516782	96%	Suelo de pastizales
M-16S-24	Bacteroidetes	Uncultured bacterium clone AKIW709	DQ129647	95%	Aerosol urbano

Tabla A1. Continuación.

Clon	Phylum	Secuencia más relacionada	Nº acceso	Identidad	Fuente
M-16S-25	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i> sp. AC72a	AY776209	98%	Suelo asociado a leguminosas
M-16S-26	Bacteroidetes	Uncultured bacterium clone FFCH5846	EU133656	95%	Suelo de pradera
M-16S-28	Acidobacteria	Uncultured bacterium clone: BS137	AB240271	98%	Rizósfera
M-16S-29	Proteobacteria	<i>Rubellimicrobium</i> sp. MSL 201	EF547368	97%	—
M-16S-30	Acidobacteria	Agricultural soil bacterium clone SC-I-35	AJ252631.1	98%	Suelo agrícola
M-16S-31	Actinobacteria	Uncultured bacterium clone ST5	DQ347892	98%	Suelo de monífculo de termitas
M-16S-33	Bacteroidetes	Uncultured soil bacterium clone L1A.2A02	AY988672	98%	Suelo
D-16S-1	Proteobacteria	Uncultured bacterium clone EACUL1A4	AY186075	98%	Depósito de ferromanganeso
D-16S-2	Firmicutes	Uncultured Bacilli bacterium clone X3Ba61	AY607149	96%	Suelo de arrozal
D-16S-3	Firmicutes	<i>Sporosarcina</i> sp. SK 55	DQ333897	98%	Suelo de vertedero
D-16S-5	Actinobacteria	Uncultured bacterium clone FFCH4202	EU133085	95%	Suelo de pradera
D-16S-6	Nitrospirae	Uncultured actinobacterium clone F12_10H_FL	EF612393	98%	Suelo
D-16S-8	Bacteroidetes	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone J35H2	DQ365987	94%	Suelo
D-16S-9	Firmicutes	Uncultured bacterium clone SR65	DQ298315	96%	Rizósfera
D-16S-10	Firmicutes	Uncultured bacterium clone AKIW897	DQ129501	98%	Aerosol urbano
D-16S-11	Actinobacteria	Uncultured bacterium clone FFCH12404	EU132763	95%	Suelo de pradera
D-16S-12	Firmicutes	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone EHFS1_S16a	EU071532	99%	Habitación limpia
D-16S-15	Chloroflexi	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> strain DSM 20745T	AJ420142	92%	—
D-16S-16	Firmicutes	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone GASP-WDOS3_D11	EF075643	98%	Suelo de pastizales
D-16S-17	Acidobacteria	Uncultured Acidobacteria bacterium clone AKYG647	AY922048	97%	Suelo agrícola

Tabla A1. Continuación.

Clon	Phylum	Secuencia más relacionada	N° acceso	Identidad	Fuente
D-16S-20	Firmicutes	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone SH765B-TzT-30	AJ519636	99%	Relave de uranio
D-16S-21	Firmicutes	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone GASP-WDOS3_D11	EF075643	98%	Suelo de pastizales
D-16S-23	Proteobacteria	Uncultured soil bacterium clone NGP 42	EU037941	91%	Suelo contaminado con pesticidas
D-16S-24	Proteobacteria	<i>Mycococcus macrosporus</i> strain Cc m7	AJ233920	99%	—
D-16S-25	Firmicutes	Uncultured soil bacterium clone 1448-1	AF423230	99%	Suelo
D-16S-26	Firmicutes	Uncultured bacterium clone AKIW956	DQ129506	99%	Aerosol urbano
D-16S-27	Firmicutes	Uncultured soil bacterium clone 1448-1	AF423230	96%	Suelo
D-16S-28	Actinobacteria	<i>Corynebacterium cf. aquaticum</i> V4.BO.26	AJ244681	98%	—
D-16S-29	Planctomycetes	Uncultured bacterium clone FFCH2895	EU135070	97%	Suelo de pradera
D-16S-30	Gemmatimonadetes	Uncultured bacterium AT425_EubC11	AY053483	90%	Hidratos gaseosos
D-16S-31	Bacteroidetes	Bacteroidetes bacterium 20/6	DQ365990	96%	Suelo
D-16S-32	Gemmatimonadetes	Uncultured bacterium clone FFCH4360	EU134800	99%	Suelo de pradera
D-16S-34	Actinobacteria	Uncultured bacterium AT425_EubC5	AY053485	90%	Hidratos gaseosos
D-16S-36	Gemmatimonadetes	Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone AUVE_06D12	EF651286	92%	Suelo de cultivo
D-16S-37	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp. 19498	AJ315066	99%	Pinturas murales
D-16S-38	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp. R33S	AY572475	99%	Suelo agrícola

Tabla A2. Relación C/N y contenido de nitrógeno, fósforo y potasio disponibles durante la incubación de los microcosmos de suelo semiárido (M: matorral) y árido (D: desierto). Tratamientos: tH2O: agua desionizada; tAc: solución ácida (pH 4,0) sin Nr; tNr: solución neutra (pH 7,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$); tNrAc: solución ácida (pH 4,0) de nitrato de amonio ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Tiempos: t0: 0 días post tratamiento; t28: 28 días post tratamiento; t56: 56 días post tratamiento; t84: 84 días post tratamiento.

		C/N	N (mg Kg^{-1})	P (mg Kg^{-1})	K (mg Kg^{-1})	
Suelo semiárido	t0	tH2O	14,47	34,00	54,00	274,00
		tAc	16,14	50,00	52,00	263,00
		tNr	14,38	76,00	37,00	297,00
		tNrAc	13,77	77,00	54,00	282,00
	t28	tH2O	19,84	48,00	49,00	303,00
		tAc	18,54	40,00	49,00	299,00
		tNr	18,01	92,00	51,00	306,00
		tNrAc	19,12	88,00	48,00	295,00
	t56	tH2O	14,08	25,00	49,00	254,00
		tAc	15,55	30,00	49,00	257,00
		tNr	14,17	57,00	53,00	258,00
		tNrAc	15,16	53,00	53,00	257,00
	t84	tH2O	16,27	21,00	38,00	256,00
		tAc	16,17	26,00	50,00	251,00
		tNr	15,60	38,00	43,00	263,00
		tNrAc	15,92	40,00	54,00	259,00
Suelo árido	t0	tH2O	11,05	10,00	8,00	484,00
		tAc	15,16	6,00	5,00	468,00
		tNr	11,44	25,00	5,00	450,00
		tNrAc	13,03	25,00	4,00	468,00
	t28	tH2O	14,52	5,00	8,00	498,00
		tAc	15,04	5,00	6,00	518,00
		tNr	14,14	27,00	5,00	495,00
		tNrAc	11,72	23,00	5,00	495,00
	t56	tH2O	17,92	5,00	5,00	505,00
		tAc	19,08	3,00	4,00	500,00
		tNr	15,37	20,00	5,00	495,00
		tNrAc	15,72	17,00	5,00	503,00
	t84	tH2O	19,80	2,00	5,00	534,00
		tAc	24,07	3,00	5,00	532,00
		tNr	21,49	14,00	6,00	529,00
		tNrAc	15,33	19,00	3,00	546,00

Tabla A3. Resultados del ANOVA de dos-vías para los parámetros edáficos, las tasas de actividad y los parámetros de diversidad, considerando como factores para el análisis los tratamientos aplicados y el tiempo de incubación de los microcosmos.

	Factores	Suelo semiárido			Suelo árido			
		% varianza	F	P	% varianza	F	P	
Parámetros edáficos ^a	pH	interacción ^d (36) ^e	6.63	1.29	0.1579	6.79	1.97	0.0041
		tratamiento(3)	0.74	1.74	0.1628	3.93	13.71	<0.0001
		tiempo (12)	77.82	45.57	<0.0001	79.35	69.20	<0.0001
	ORP	interacción (36)	7.15	3.53	<0.0001	5.90	1.74	0.0158
		tratamiento(3)	12.66	74.88	<0.0001	0.48	1.69	0.1729
		tiempo (12)	74.33	109.90	<0.0001	83.85	74.32	<0.0001
	CH	interacción (36)	1.28	0.65	0.9287	1.30	0.39	0.9991
		tratamiento(3)	0.50	3.01	0.0334	0.32	1.17	0.3248
		tiempo (12)	92.51	140.50	<0.0001	88.75	79.91	<0.0001
	MO	interacción (36)	9.46	0.65	0.9319	12.96	0.76	0.8216
		tratamiento(3)	1.71	1.40	0.2461	1.46	1.03	0.3830
		tiempo (12)	46.49	9.52	<0.0001	36.46	6.43	<0.0001
	NH ₄ ⁺	interacción (36)	11.73	1.03	0.4397	11.50	3.89	<0.0001
		tratamiento(3)	15.84	16.68	<0.0001	62.55	253.70	<0.0001
		tiempo (12)	39.52	10.41	<0.0001	17.40	17.65	<0.0001
	NO ₃ ⁻	interacción (36)	6.48	1.66	0.0253	4.30	3.19	<0.0001
		tratamiento(3)	38.40	117.90	<0.0001	85.84	764.10	<0.0001
		tiempo (12)	43.82	33.63	<0.0001	5.96	13.26	<0.0001
Tasas de actividad ^b	amonificación	interacción (9)	9.24	1.41	0.2267	37.08	16.88	<0.0001
		tratamiento (3)	2.42	1.10	0.3621	1.21	1.66	0.1954
		tiempo (3)	64.99	29.68	<0.0001	53.89	73.61	<0.0001
	nitrificación	interacción (9)	14.06	3.76	0.0026	37.65	4.28	0.0010
		tratamiento (3)	0.50	0.40	0.7553	5.59	1.91	0.1481
		tiempo (3)	72.14	57.81	<0.0001	25.50	8.70	0.0002
	desnitrificación	interacción (9)	20.45	7.68	<0.0001	52.50	9.47	<0.0001
		tratamiento (3)	7.75	8.73	0.0002	2.12	1.15	0.3450
		tiempo (3)	62.33	70.22	<0.0001	25.68	13.90	<0.0001
Diversidad ^c	H'	interacción (6)	18.02	1.48	0.2288	8.20	1.17	0.3530
		tratamiento (3)	8.63	1.41	0.2633	11.04	1.57	0.2352
		tiempo (2)	24.46	6.01	0.0077	43.29	18.49	0.0006
	J	interacción (6)	14.82	0.96	0.4695	15.00	1.35	0.2951
		tratamiento (3)	22.57	2.94	0.0537	24.38	2.19	0.1296
		tiempo (2)	1.16	0.23	0.7987	1.12	0.30	0.5905
	S	interacción (6)	15.39	1.18	0.3497	5.86	1.09	0.3807
		tratamiento (3)	4.70	0.72	0.5493	7.28	1.36	0.2911
		tiempo (2)	27.77	6.39	0.0060	58.29	32.64	<0.0001

^a pH; potencial de óxido reducción (ORP); contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH₄⁺); contenido de nitrato (NO₃⁻).

^b Amonificación: producción/consumo de amonio; nitrificación: producción/consumo de nitrato; desnitrificación: producción/consumo de óxido nítrico.

^c Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H'); Índice de equitatividad (J) y Riqueza (S) de los perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP).

^d interacción = tratamiento x tiempo.

^e Grados de libertad