

UCH-FC  
B. Ambiental  
E 77  
C. 1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**EFFECTO DEL AMONIO SOBRE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD  
DE BACTERIAS NITRIFICANTES DE RIZÓSFERA Y SUELO SIN  
COBERTURA VEGETAL**

**Seminario de Título**

**Entregado a la**

**Universidad de Chile**

**en cumplimiento parcial de los requisitos**

**para optar al Título de**

**Biólogo con Mención en Medio Ambiente**

**por**

**María Fernanda Espinosa Ipinza**

**Junio, 2007  
Santiago - Chile**



**Director de Seminario de Título:  
Dra. Margarita Carú**



## “EFECTO DEL AMONIO SOBRE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD DE BACTERIAS NITRIFICANTES DE RIZÓSFERA Y SUELO SIN COBERTURA VEGETAL”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con Mención en Medio Ambiente.

**MARÍA FERNANDA ESPINOSA IPINZA**

*Dra. Margarita Carú Marambio*  
**Directora Seminario de Título**



**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

*Dr. Víctor Cifuentes Guzmán*  
**Presidente Comisión**

*Dr. Elie Poulin*  
**Corrector**



Santiago de Chile, Junio de 2007



*A mis papás y abuelos*

## Agradecimientos

Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento del proyecto Fondecyt 1040880.

A mi profe, la Dra. Margarita Carú, por la paciencia, la buena disposición y el tiempo, además del espacio que me dio para poder desarrollar este proyecto. Pero eso también es en gran parte gracias a la Julieta que estuvo ahí corrigiéndome y ayudándome, muchas gracias por tu paciencia y tus consejos. A mis compañeros del lab, Juanita (la reina del laboratorio), Rafa, Cata, Lore, Marco, Felipe, por la buena onda y buena disposición, por haberme acogido tan bien, lo pase muy bien trabajando con ustedes. Y como no todo es trabajo hay q agradecerle a Tomas por poner a nuestra disposición sus instalaciones las charlas científicas muy relevantes, jajajaja.

A mis papás y mis hermanos, por el apoyo en este largo camino que tuvo varios tropezones, por la paciencia y el cariño que me han dado.

A Fernando Ipinza, mi tata, por estar conmigo y aconsejarme sobre todo cuando decidí cambiarme de carrera.

A mis amigas de la vida y de la infancia -Paula, Nati, Lollito, Xaxa - por todos los buenos momentos que pasamos, sobre todo por llenarme de otras cosas fuera de la ciencia, por crecer conmigo.

A Pablo, Carola, Mariela y Costa por ser un apoyo siempre y por todas las cosas buenas q hemos pasado, los quiero mucho cabritos. A Nacho por saber siempre como subir el anífo y darme excelentes ideas, yo se que en algún minuto haremos esos proyectos que pensamos. Al Negro, Felipe, Richard, Pilors, Maca-Matu pack, Tuti, PIANTEAM completo y a los demás que se me quedan por los buenos momentos, los viajes, los paseos, y el despeje en general para evitar el estrés.



## RESEÑA



María Fernanda Espinosa, nacida en Santiago el 14 de diciembre de 1980. Hija de una afectuosa y muy unida familia, desde muy pequeña manifestó un claro amor por las ciencias naturales. Excelente estudiante y compañera. Siempre crítica e insatisfecha con los desafíos que le presentaba el colegio, forjó firmemente su camino a través de los estudios primarios hacia la universidad. Es así como entra al programa de bachillerato de la Universidad de Chile en busca de su verdadero futuro, y donde comienza a formar su grupo de incondicionales amigos que la acompañarán por estas nuevas sendas. ¿Su decisión luego de terminar bachillerato?, la biotecnología y posteriormente, más específicamente la biología ambiental, es aquí donde afloran y se desarrollan sus capacidades como profesional y científica, que dan por terminada la primera parte de su formación y de sus estudios en la academia, ¿y ahora? ¿Qué nuevos caminos le tendrá preparado el porvenir?

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'I. Moreno'.

por Ignacio Moreno  
compañero de sueños, colega y amigo.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS



<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>RESEÑA</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>MATERIALES &amp; MÉTODOS</b> .....	7
1. MUESTREO .....	7
2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS EDÁFICOS .....	8
3. MONTAJE DE LOS MICROCOSMOS .....	8
4. PERFILES DE NITRATO Y AMONIO .....	9
4.1 Extracción de Nitrógeno mineral .....	9
4.2 Mediciones de nitrato y amonio .....	9
5. PERFILES FISIOLÓGICOS A NIVEL DE COMUNIDAD (CLPP) .....	9
6. TÉCNICAS MOLECULARES .....	10
6.1 Extracción de DNA desde muestras de suelo .....	10
6.2 Amplificación del gen <i>amoA</i> .....	10
6.3 Perfiles de T-RFLP .....	11
6.4. Clonación y Secuenciación .....	12
7. ANÁLISIS DE LOS DATOS .....	13
7.1. Variabilidad de parámetros edáficos. Análisis Estadísticos .....	13
7.2. Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP) .....	13
7.3. T-RFLP <i>amoA</i> .....	14
7.4. Análisis de las secuencias .....	14
<b>RESULTADOS</b> .....	15
1. CONSTRUCCIÓN DE MICROCOSMOS (MCS) Y PARÁMETROS EDÁFICOS .....	15
2. PERFILES DE NITRATO/AMONIO EN LOS MICROCOSMOS (MC) .....	16
3. PERFILES FISIOLÓGICOS A NIVEL DE COMUNIDAD (CLPP) .....	20
4.- ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LA BACTERIAS AOB PRESENTES EN LOS MICROCOSMOS .....	22
4.1 Extracción de DNA desde muestras de suelo .....	22
4.2. Amplificación del gen <i>amoA</i> y perfiles de T-RFLP .....	23
4.3. Clonación y Secuenciación .....	28
<b>DISCUSIÓN</b> .....	31

1. VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  EN LOS MICROCOSMOS Y SU RELACIÓN CON LOS GRUPOS FUNCIONALES DEL NITRÓGENO.....31

2. CLPP Y RESPUESTA METABÓLICA DE LA COMUNIDAD A LA ADICIÓN DE AMONIO .....33

3. EFECTO DEL AMONIO SOBRE LA DIVERSIDAD DE BACTERIAS OXIDADORAS DE AMONIO .....34

CONCLUSIONES .....39

REFERENCIAS .....41



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Metodología usada en la determinación de los parámetros edáficos.....</b>	<b>8</b>
<b>Tabla 2. Partidores usados para la amplificación del gen <i>amoA</i> de los oxidadores de amonio.....</b>	<b>11</b>
<b>Tabla 3. Valor promedio de parámetros edáficos de los suelos usados para el montaje de los microcosmos.....</b>	<b>16</b>
<b>Tabla 4. Asociación de TRFs obtenidos para el gen <i>amoA</i> a géneros de oxidadores de amonio en la base de datos del GeneBank.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 5. Identificación de los clones de <i>amoA</i> usando el programa BLASTN en NCBI.....</b>	<b>29</b>





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Ciclo del Nitrógeno .....</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2. Ubicación geográfica del sitio de muestreo.....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 3. Representación gráfica del método de T-RFLP.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 4. Contenido de amonio y nitrato de los MC-CoI-4 y MC-CoI-5.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 5. Contenido de amonio y nitrato de MCR-NA25.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 6. Contenido de amonio y nitrato de MCS-1 y MCS-5.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 7. Diversidad metabólica de la comunidad (CMD) a lo largo del tiempo.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 8. Dendrograma de la comunidad microbiana .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 9. Electroforesis del DNA total extraído de los MCs.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 10. Electroforesis de los amplicones del gen <i>amoA</i> usando los partidores <i>amoA</i>-2F y <i>amoA</i>-5R.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 11. Resultado de la segunda amplificación del gen <i>amoA</i> usando los partidores <i>amoA</i>-1F y <i>amoA</i>-2R.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 12. Electroferograma obtenido para los T-RFLP de <i>amoA</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 13. Frecuencia acumulada de los principales TRFs del gen <i>amoA</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 14. Análisis de la diversidad de clones de <i>amoA</i>.....</b>	<b>29</b>

<b>Figura 15. Relaciones filogenéticas el gen <i>amoA</i> de clones ambientales obtenidos a partir de muestras de los MC de suelo y rizósfera .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 16. Ciclo del Nitrógeno resultante en los MCs.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 17. Relaciones filogenéticas el gen <i>amoA</i> de clones ambientales obtenidos a partir de muestras de los MC de suelo y rizósfera (por cluster) .....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BSA:** Seroalbúmina bovina.

**BLASTN:** Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide.

**CLPP:** Community level physiological profile

**dNTP:** Deoxiribonucleotido trifosfato

**EDTA:** Ácido etilendiaminetetracético

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

**RFLP:** Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo en el largo de los fragmentos)

**TAE:** Tris-ácido acético-EDTA

**T-RFLP:** Terminal restriction fragment length polymorphism (polimorfismo en el largo de los fragmentos terminales)

**TRFs:** Terminal restriction fragment (fragmentos terminales de restricción)

**Tris:** Tris (hidroximetil) aminoetano

**UPGMA:** Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas)

## RESUMEN

El destino y distribución de los compuestos nitrogenados en los ecosistemas dependen de los procesos microbiológicos que regulan el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. En este trabajo se estudió el efecto del amonio sobre la diversidad de bacterias nitrificantes y de la comunidad bacteriana. Para ello se utilizó un ensayo de microcosmos con suelo rizosférico y no-rizosférico, incubado durante 90 días a 20°C. Se determinó el contenido de amonio y nitrato por colorimetría y el perfil fisiológico a nivel de la comunidad (CLPP) con el sistema BIOLOG Eco-Plate. La diversidad de filotipos se determinó con el marcador molecular *amoA* amplificado por PCR y resuelto mediante T-RFLP. Los amplicones del gen *amoA* fueron clonados y secuenciados. Los resultados muestran que durante los primeros 15 días hay producción de nitrato, el cual disminuye rápidamente en la rizósfera y más lentamente en el suelo. Por el contrario, el amonio presentó un comportamiento cíclico durante los 90 días, probablemente por efecto de amonificación. Los patrones de utilización potencial de fuentes de carbono discriminan entre las muestras de suelo rizosférico y no-rizosférico, obteniéndose resultados reproducibles entre réplicas de microcosmos independientes. En cuanto a los perfiles de T-RFLP, no se observan cambios importantes en la diversidad del gremio de oxidadores de amonio, manteniendo un patrón similar tanto en suelo como en rizósfera. El análisis *in silico* de los TRFs y la secuencia de clones del gen *amoA* indican que los oxidadores de amonio predominantes en estos habitat están estrechamente relacionados con *Nitrosospira* y *Nitrosomonadales*.

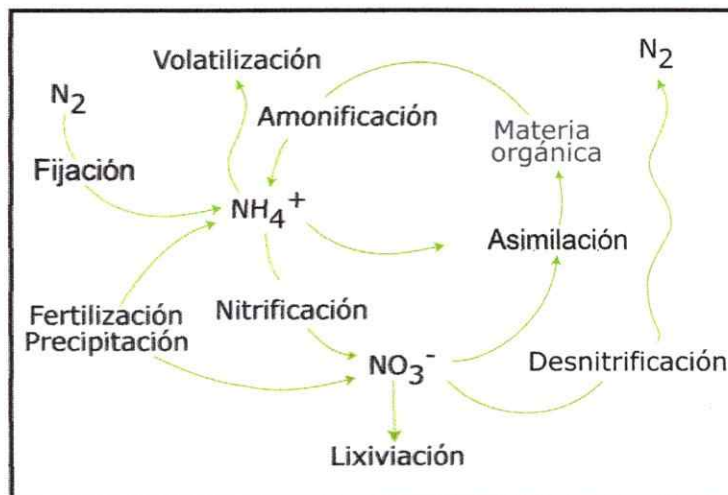
## ABSTRACT

The fate and distribution of nitrogenated compounds in the ecosystems depend on the microbiological processes that regulate the nitrogen biogeochemical cycle. In this work, the effect of ammonium on the diversity of nitrifying bacteria and the total bacterial community was studied. To achieve this, a microcosm was set-up with rhizospheric and non-rhizospheric soil and incubated for 90 days at 20°C. The ammonium and nitrate content were determined colorimetrically and the community level physiological profile (CLPP) was determined using the BIOLOG Eco-Plate system. The phylotype diversity was determined using the *amoA* molecular marker amplified by PCR and resolved using T-RFLP. The *amoA* amplicons were cloned and sequenced. The results show that during the first 15 days there is production of nitrate, which decreases rapidly in the rhizosphere and more slowly in soil. On the other hand, the ammonium had a cyclic behavior during the 90 days, possibly due to the effect of ammonification. The potential carbon source utilization profiles discriminate between rhizospheric and non-rhizospheric soil, thus obtaining reproducible results between replicates of independent microcosms. With respect to the T-RFLP profiles, there were no important changes observed in the diversity of the ammonium oxidizing guild, where a similar pattern was observed both in the soil as well as in the rhizosphere. The *in-silico* analysis of the TRFs and the clone sequences of the *amoA* gene indicate that the predominant ammonium oxidizers in these habitats are closely related to *Nitrosospira* and *Nitrosomonadales*.

## INTRODUCCIÓN

La productividad primaria en la mayoría de los ecosistemas terrestres está limitada por nitrógeno (Vitousek & Howarth, 1991), y alteraciones en la biogeoquímica de dicho elemento a menudo afectan profundamente la productividad y sustentabilidad de estos sistemas. Para describir el impacto de la actividad humana en el ecosistema es esencial caracterizar las comunidades microbianas que en él habitan, cambios en la abundancia y diversidad de éstas pueden resultar en tasas alteradas de sus funciones (Calbrix et al, 2005). Esto es especialmente probable para los grupos involucrados en el ciclo del nitrógeno dado el bajo grado de redundancia funcional de esta microbiota (Wolters et al, 2000).

Si bien la aplicación de fertilizante nitrogenado mejora la productividad del suelo, ésta ha tenido importantes efectos ambientales perjudiciales. El destino y distribución de los compuestos nitrogenados en los ecosistemas dependen de los procesos microbiológicos que regulan el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. El ciclo del nitrógeno (Figura 1) involucra gran variedad de reacciones de óxido-reducción, las cuales pueden ser resumidas en 3 etapas claves: i) fijación, reducción de dinitrógeno gaseoso a amonio; ii) nitrificación, oxidación de amonio a nitrato; y iii) desnitrificación, retorno del nitrógeno a su estado gaseoso.



**Figura 1.** Ciclo del Nitrógeno.

Este trabajo se centra en la nitrificación. La importancia de la nitrificación en la rizósfera es su efecto sobre el contenido relativo de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), que constituyen las formas más comunes en que las plantas y microorganismos incorporan nitrógeno. Durante la nitrificación, el  $\text{NH}_4^+$  es convertido a  $\text{NO}_3^-$  en un proceso que es llevado a cabo en dos etapas, generándose inicialmente nitrito y luego a partir de éste, nitrato. La primera etapa es mediada por las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) encargadas de oxidar el amonio a nitrito, seguidas en forma secuencial por otro gremio bacteriano encargado de oxidar nitrito a nitrato (NOB: bacterias oxidadoras de nitrito) (Madigan et al, 1999). En el suelo los dos principales géneros de bacterias nitrificantes son *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.

Actualmente, el estudio de los grupos bacterianos responsables del ciclo del nitrógeno y el efecto de factores bióticos y abióticos sobre su función, cobra mayor relevancia ya que este ciclo es uno de los más perturbados por acción antropogénica (Galloway et al, 2003).

La oxidación de amonio es el paso limitante de la nitrificación, la cual actúa como un proceso de movilización del nitrógeno en el suelo. Esta movilización se produce al transformar iones cargados positivamente ( $\text{NH}_4^+$ ), que se unen preferentemente a las partículas de arcilla con carga contraria, en moléculas de carga negativa ( $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) capaces de difundir por el suelo (Mednum et al, 1999; Atlas & Bartha, 2002). Relativamente pocos géneros bacterianos intervienen en la nitrificación por lo que cualquier tipo de estrés ambiental puede afectarla gravemente.

Al considerarse la oxidación del amonio como la reacción limitante de la nitrificación, las AOB han recibido mayor atención en los últimos años (De Boer & Kowalchuk, 2001; Risgaard-Petersen et al, 2004;). Las AOB son microorganismos quimiolitotróficos 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 usado para analizar la composición y diversidad de las comunidades de las AOB (Nicolaisen & Ramsing, 2002; Norton et al, 2002; Bernhard et al, 2005; Yeager et al, 2005). Las AOB se encuentran en la mayoría de los hábitats aeróbicos donde el amonio está disponible mediante la mineralización de la materia orgánica o por fuentes antropogénicas y, por ende, ellas son ubicuas en suelo, agua dulce y ambientes marinos (Kowalchuk & Stephen, 2001; Horz, 2004). Dada su ubicuidad, además de un metabolismo representado por enzimas únicas y su origen monofilético, estas bacterias son ideales como objeto de estudio (Bothe et al, 2000). Sin embargo, los estudios ecológicos de las AOB fueron por mucho tiempo impedidos por las dificultades para aislar y cultivar estos microorganismos (Kowalchuk &



Stephen, 2001). En la actualidad existen diversas estrategias independientes de cultivo para estudiar a las bacterias en sus ambientes naturales, especialmente aquellas que aún no se cultivan (Bothe et al, 2000). Las aproximaciones moleculares para el estudio de la composición y diversidad de las AOB se basan principalmente en la amplificación por PCR de un marcador funcional, el gen *amoA*, que codifica para la subunidad alfa de la enzima AMO (Kowalchuk & Stephen, 2001; Norton et al, 2002; Nicolaisen & Ramsing, 2002).

Para la resolución de los amplicones de similar tamaño pero que difieren en secuencia se utilizan diferentes técnicas, entre ellas los perfiles de T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) (Liu et al, 1997, Marsh et al, 2000). El análisis de genes funcionales mediante el polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción terminales (T-RFLP) (Liu et al, 1997), provee un robusto método independiente de cultivo para examinar la diversidad de las bacterias oxidadoras de amonio y la composición de la comunidad total, ya que se ha comprobado que el marcador molecular *amoA* presenta una mayor variación en su secuencia versus el 16S rDNA, lo que permite una mayor discriminación incluso entre poblaciones cercanamente relacionadas (De Boer & Kowalchuk, 2001; O`Mullan & Ward, 2005). El análisis de T-RFLP, provee una representación semi-cuantitativa de la distribución de secuencias (riqueza) y abundancia relativa (equitatividad) entre muestras (Yeager, 2005).

El estudio de la diversidad y función de grupos microbianos participantes en el ciclo del nitrógeno se ha realizado en gran variedad de hábitats, entre los que se cuentan suelos de bosques (Mintie et al, 2003) y de sistemas agrícolas (Mednum et al,

1999; Okano et al, 2004), donde el ingreso de nitrógeno por vía antropogénica o natural parece ser bastante relevante. Sin embargo hay muy poca información sobre las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera de las plantas actinorrícicas, las cuales establecen simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno (Schwencke & Carú 2001). En la rizósfera actinorrícica hay un incremento del nitrógeno combinado debido a la fijación biológica (Carú et al, 2003; Chávez & Carú, 2006), lo que sugiere que este ecosistema edáfico podría ser un modelo adecuado para el estudio de la diversidad y la función de grupos microbianos del ciclo del nitrógeno.

En base a los antecedentes presentados, se propone estudiar el efecto del amonio sobre la función y composición de bacterias nitrificantes. Para esto se utilizarán como modelo de estudio microcosmos de suelo rizosférico de plantas actinorrícicas (*Colletia hystrix*); no actinorrícicas y suelo sin cobertura vegetal.

Como hipótesis se plantea que dado que el amonio es la fuente de energía de las bacterias nitrificantes, la adición de amonio al suelo producirá un aumento en la actividad nitrificante de este grupo de bacterias, sin afectar su composición. La actividad nitrificante será mayor en los microcosmos derivados de rizósfera debido a la mayor abundancia de microorganismos en comparación a suelo sin cobertura. La rizósfera actinorrícica presentará la mayor actividad debido al mayor contenido de nitrógeno combinado.

El objetivo general del trabajo fue evaluar el efecto del amonio sobre la composición y actividad del gremio de bacterias nitrificantes y sobre el comportamiento

metabólico de la comunidad bacteriana de la rizósfera y suelo sin cobertura vegetal en un ensayo de microcosmos. Como objetivos específicos se plantearon:

- 1.- Determinar la tasa de nitrificación evaluando los cambios del contenido de amonio y nitrato en el tiempo.
- 2.- Determinar la diversidad de filotipos de bacterias oxidadoras de amonio en suelo y rizósfera mediante patrones de T-RFLP derivados de una mezcla de amplicones del marcador molecular *amoA*.
- 3.- Identificar los oxidadores de amonio predominantes en las condiciones de estudio mediante clonación y secuenciación del marcador molecular *amoA*.
- 4.- Determinar la diversidad metabólica potencial de la comunidad microbiana en los microcosmos luego del tiempo de incubación mediante perfiles fisiológicos a nivel de comunidad.

## MATERIALES & MÉTODOS

### 1. Muestreo

Las muestras fueron tomadas en la localidad de "El Romeral" ( $33^{\circ} 48'S$ ;  $70^{\circ} 14'W$ ) (Figura 2), ubicada dentro del sector del cajón del Maipo, Región Metropolitana. El sitio corresponde a una zona semiárida del matorral esclerófilo de Chile Central definido por una población de *Colletia hystrix*. Las muestras para este estudio se obtuvieron desde la rizósfera de *Colletia hystrix* (muestras Col-4 y Col-5), desde la rizósfera de una planta no-actinorrícica como *Quillaja Saponaria* (muestra N.A-25) y desde suelo sin cobertura vegetal (muestras S-1 y S-5). Las muestras están distribuidas en una área de aproximadamente 10 x 10 m. Las muestras fueron tomadas a 10 cm de profundidad, homogenizadas y almacenadas a  $4^{\circ}C$  hasta su utilización.



Figura 2. Ubicación geográfica del sitio de muestreo.

El cuadrado rojo indica la zona de "El Romeral".

## 2. Determinación de parámetros edáficos

Los parámetros edáficos fueron determinados en el laboratorio de diagnóstico del INIA (Instituto de Investigación Agropecuaria) en base a métodos estándares. Se determinó para cada muestra: contenido de materia orgánica, y contenido de nitrógeno, potasio y fósforo. La metodología usada se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Metodología usada en la determinación de los parámetros edáficos.

Parámetro edáfico	Metodología usada
Materia Orgánica	Combustión húmeda y determinación colorimétrica del cromato reducido.
Nitrógeno	Digestión de Kjeldahl.
Fósforo	Extracción con bicarbonato 0.5 M (pH 8,5) y determinación colorimétrica del azul de molibdeno.
Potasio	Extracto de saturación y espectrofotometría de absorción y emisión atómica.

## 3. Montaje de los microcosmos

Los microcosmos (MC) fueron preparados de la siguiente manera: 50 g de suelo fueron suplementados con una solución de sulfato de amonio a una concentración final de 200 y 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  de suelo para alcanzar un 20% de la capacidad de retención de agua. Como control se utilizó suelo regado con agua desionizada al mismo porcentaje de capacidad de retención antes descrito. Estos MC fueron incubados a 20°C durante 90 días.

#### **4. Perfiles de nitrato y amonio**

##### **4.1 Extracción de Nitrógeno mineral**

La extracción de nitrógeno mineral se realizó según una modificación del protocolo descrito por Forster (1995). Para optimizar la extracción se probaron tres soluciones extractantes: KCl 2 M,  $KAl(SO_4)_2$  al 1% y agua desionizada a una razón de mezcla 1:8 (masa:volúmen) sobre suelo actinorrífico regado al 20% de su capacidad de retención con: i) agua desionizada, ii) solución de  $400 \text{ ug g}^{-1}$  de  $KNO_3$  y iii) solución de  $400 \text{ ug g}^{-1}$  de  $(NH_4)_2SO_4$ . Además, como control de la retención que pudiera ejercer el suelo sobre el nitrógeno mineral se probaron los extractantes directamente sobre las soluciones de nitrato y amonio antes mencionadas. En base a lo obtenido se decidió utilizar agua como solución extractante.

##### **4.2 Mediciones de nitrato y amonio**

Las concentraciones de  $NO_3^-$  y  $NH_4^+$  se determinaron mediante métodos colorimétricos descritos por Forster (1995). Todas las determinaciones fueron realizadas en duplicado.

#### **5. Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP)**

Para evaluar la diversidad metabólica potencial de la comunidad microbiana se utilizó el método BIOLOG mediante EcoPlate™ que permite detectar la utilización de 31 fuentes de carbono. Los inóculos para las EcoPlate™ se prepararon a partir de 1 g de suelo fresco resuspendido en buffer PBS estéril y agitado durante toda la noche. Las suspensiones de suelo fueron plaqueadas en medio DNB sólido e incubadas a  $27^\circ\text{C}$  por 48 h para determinar el número de microorganismos viables en cada muestra. Las placas BIOLOG EcoPlate™ se inocularon con  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de las

suspensiones de suelo ajustadas para obtener  $10^5$  microorganismos cultivables por pocillo y se incubaron a 27°C por una semana. El desarrollo de color en los pocillos individuales que indica la utilización de las fuentes de carbono fue registrado cada 12 h (Garland, 1997).

## 6. Técnicas moleculares

### 6.1 Extracción de DNA desde muestras de suelo

El DNA total de las muestras se obtuvo a partir de 0,25 g de suelo empleando el kit de extracción "UltraClean Soil DNA" (MoBio Laboratories®) según instrucciones del fabricante. El DNA obtenido fue visualizado en geles de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y almacenado a -20°C.

### 6.2 Amplificación del gen *amoA*

El gen *amoA* fue amplificado usando una estrategia de PCR anidado (Yeager, 2005). Para la amplificación se utilizaron los partidores descritos en la Tabla 2. En el primer PCR se usaron los partidores *amoA*-2F y *amoA*-5R (Webster et al, 2002) a una concentración de 7 pmol en 25  $\mu\text{l}$  de reacción que contenía buffer de PCR 1X, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , una mezcla de los 4 dNTPs a 200  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{g}$  de BSA (Gibco BRL®), 2,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen®) y agua nanodesionizada hasta completar 24  $\mu\text{l}$ . Se usó como templado 1  $\mu\text{l}$  de DNA extraído de suelo. La amplificación se realizó usando un método de "touchdown" (Webster et al, 2002) con los siguientes pasos secuenciales: desnaturalización inicial 94°C por 5 min; seguido por 20 ciclos a 94°C por 40 seg (desnaturalización), 55°C por 5 seg bajando  $0,2^\circ\text{C seg}^{-1}$  hasta 45°C por ciclo (hibridación), 72°C por 1 min (extensión); luego 15 ciclos a 94°C por 40 seg , 45°C por 50 seg, 72°C por 1 min; para terminar con una extensión final de 7 min a 72°C.

Para el PCR anidado, 2  $\mu$ l del producto de la primera reacción fueron usados como templado para la segunda reacción de PCR utilizando 20 pmol de los partidores *amoA*-1F y *amoA*-2R (Rotthauwe et al, 1997) (Tabla 2). El resto de los reactivos para la mezcla de reacción se usaron en las mismas concentraciones que en el primer PCR. Los parámetros de amplificación fueron: desnaturación inicial a 95°C por 5 min; seguido de 40 ciclos de desnaturación a 94°C por 45 seg, hibridación a 60°C por 1 min, y extensión a 72°C por 1 min; se terminó con una extensión final de 10 min a 72°C. Los amplicones de *amoA* para el análisis de T-RFLP se generaron usando el partidor *amoA*-1F de la segunda reacción de PCR marcado en el extremo 5' con NED (2,7,8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein) (Operon Inc. Technologies). La correcta amplificación de DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en buffer TAE 1X teñidos con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>).

**Tabla 2.** Partidores usados para la amplificación del gen *amoA* de los oxidadores de amonio.

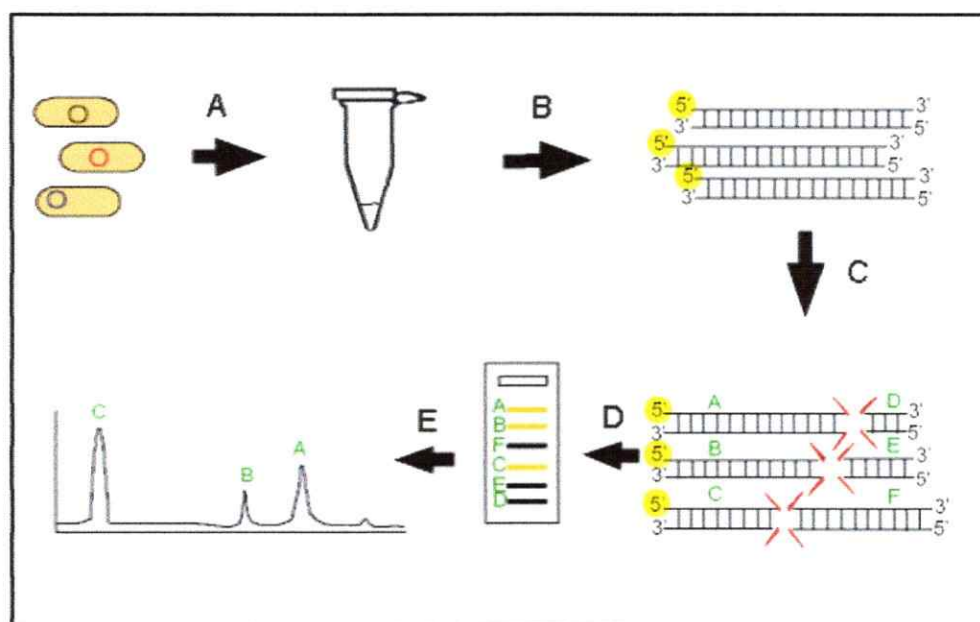
Partidor	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>amoA</i> -2F	AAR GCG GCS AAG ATG CCG CC	800	Webster et al, 2002
<i>amoA</i> -5R	TTA TTT GAT CCC CTC		
<i>amoA</i> -1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	490	Rotthauwe et al, 1997
<i>amoA</i> -2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC		

### 6.3 Perfiles de T-RFLP

Los productos de PCR fluorescentes se purificaron usando el kit UltraClean™ PCR Clean-up™ (Mobio Lab) y se cuantificaron usando el programa computacional Un-Scan-It gel (Silk Scientific Corporation). 20-50 ng de producto marcado fueron digeridos usando la enzima de restricción *HhaI* (New England Biolabs). Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 3100 Avant-Genetic-Analyzer Prism®. Los tamaños de los TRFs (Terminal restriction



fragments) se determinaron empleando el programa de análisis GeneScan 3.1 (ABI). El procedimiento general de la metodología de los T-RFLP se esquematiza en la Figura 3.



**Figura 3.** Representación gráfica del método de T-RFLP. **A.** Extracción de DNA. **B.** Amplificación del gen de interés usando un partidor marcado. **C.** Digestión del producto con una enzima de restricción. **D.** Separación de TRFs por electroforesis capilar. **E.** Electroferograma resultante.

#### 6.4. Clonación y Secuenciación

Para la construcción de una genoteca de bacterias AOB, los amplicones del gen *amoA* obtenidos de las muestras de suelo se clonaron en células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  usando el TA Cloning<sup>®</sup> Kit Dual Promoter (pCR<sup>®</sup>II) según las indicaciones del fabricante. Los clones obtenidos fueron caracterizados por sus patrones de RFLP. A partir de cada clon se realizó una amplificación del inserto y el amplicón obtenido fue digerido con *Hae*III. Los fragmentos de restricción se resolvieron

por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en buffer TAE 1X. Los clones con distinto patrón de RFLP fueron secuenciados en un secuenciador ABI 1.6.0 .

## **7. Análisis de los datos**

### **7.1. Variabilidad de parámetros edáficos. Análisis estadísticos.**

Para determinar diferencias significativas entre los parámetros edáficos de los suelos, se tomaron datos obtenidos desde siete puntos de cada tipo de suelo para un muestreo realizado durante el mes de Octubre y se utilizó un análisis estadístico no paramétrico, el análisis de varianza de Kruskal-Wallis seguido de el test de comparación múltiple de Dunn, considerando un intervalo de confianza de 95%. Para estos propósitos se utilizó como herramienta el software GraphPad Prism versión 4.0 para Windows, San Diego California USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### **7.2. Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP)**

La diversidad metabólica de la comunidad (DMC) se obtuvo mediante BIOLOG EcoPlate™ graficando el desarrollo de color en los pocillos individuales en el tiempo. Para comparar los perfiles de CLPP se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia. La similitud entre las muestras fue estimada mediante el índice de Simple Matching y el algoritmo de agrupamiento UPGMA (Unweighted pairs group method with arithmetic average). El dendrograma fue obtenido usando el programa TREECON (Van de Peer & De Wachter, 1994). Se realizó análisis de bootstrap sobre 100 réplicas graficando sólo los valores sobre 50%.

### **7.3. T-RFLP *amoA***

Los TRFs obtenidos sobre 50 UF fueron analizados en base a presencia y fluorescencia relativa a fin de compararlos entre muestras. Se obtuvieron en el

GenBank secuencias de AOB conocidas, las cuales se digirieron *in silico* utilizando el programa informático Bioedit Sequence Alingment Editor versión 7.0.5.2 (Hall, 1999) para identificar los posibles biotipos presentes en los microcosmos.

#### **7.4. Análisis de las secuencias**

La identidad de las secuencias de los clones se evaluó utilizado el programa BLASTN en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al, 1997). Las secuencias de referencia utilizadas en las filogenias se obtuvieron de la base de datos del GenBank. Las secuencias se alinearon usando el programa Bioedit Sequence Alingment Editor versión 7.0.5.2 (Hall, 1999) y el árbol filogenético se realizó con el programa TREECON (Van de Peer & De Wachter, 1994). Para esto se escogió un modelo de sustitución que asume igual frecuencia de bases e igual tasa de sustitución de éstas a lo largo de la evolución, Jukes & Cantor (1969). Para inferir la topología del árbol se usó el algoritmo de distancia UPGMA para observar el agrupamiento y relación de los clones obtenidos con las secuencias conocidas presentes en la base de datos del GenBank. Se realizó un análisis de bootstrap para determinar la confianza de las filogenias obtenidas.

## RESULTADOS

### 1. Construcción de microcosmos (MC) y parámetros edáficos

Para la construcción de los microcosmos se utilizó suelo rizosférico y suelo sin cobertura vegetal. Los MC contruidos con rizósfera actinorríca derivada de *Colletia hystrix* (Col-4 y Col-5) se designaron como MCR-Col4 y MCR-Col5 y con rizósfera no actinorríca derivada de *Quillaja saponaria* (NA25) como MCR-NA25. Los MC contruidos con suelo sin cobertura (S-1 y S-4) se identificaron como MCS-1 y MCS-5. En la Tabla 3 se muestran el porcentaje de materia orgánica y el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio disponibles presentes en los suelos y rizósfera utilizados en este estudio. En general, se observa un mayor contenido de materia orgánica y de nutrientes en los suelos asociados a rizósfera contruidos con el suelo sin cobertura vegetal.

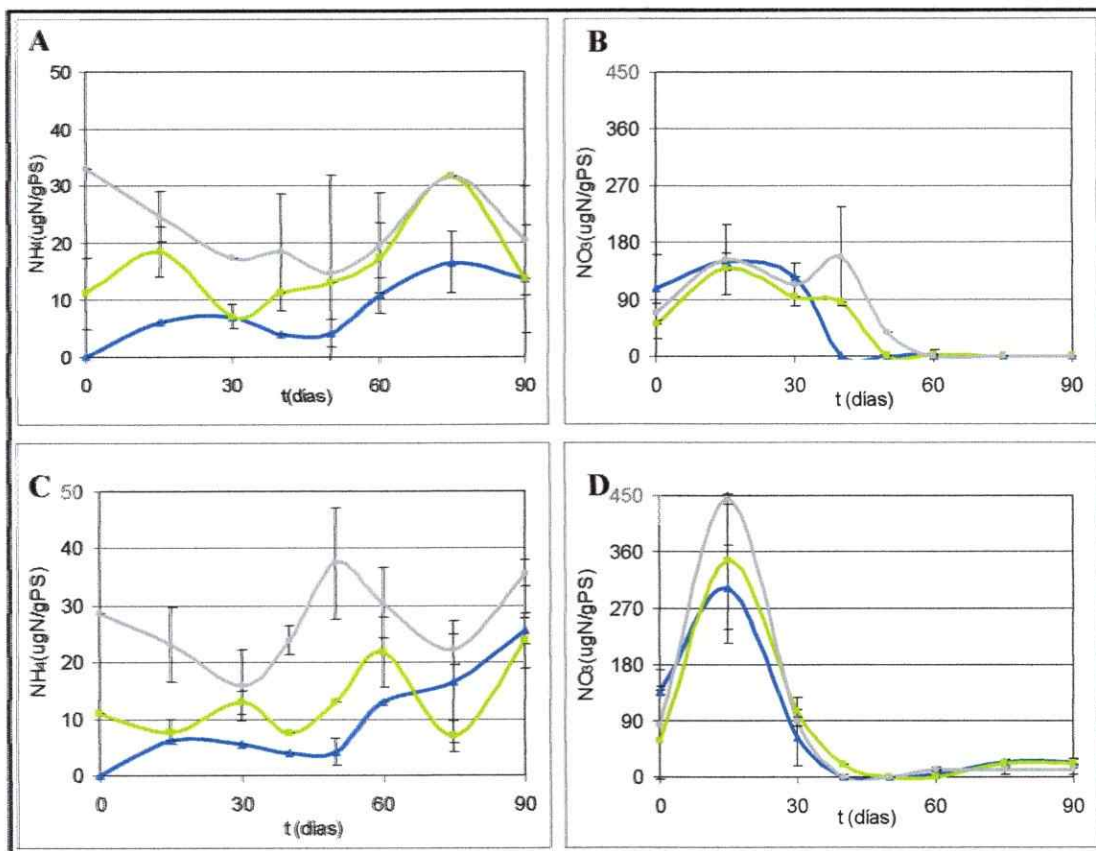
Usando el análisis de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn ( $p < 0,05$ ), se puede observar que los suelos analizados no difieren significativamente en la cantidad de potasio disponible. Por otra parte, el contenido de materia orgánica permite diferenciar la rizósfera actinorríca proveniente de *Colletia hystrix* del suelo sin cobertura vegetal, pero ninguno de éstos difiere significativamente del suelo rizosférico no actinorríco. En cuanto al nitrógeno disponible, se pueden observar sólo diferencias al contrastar los suelos provenientes de rizósfera. Finalmente, el contenido de fósforo difiere entre ambos suelos derivados de rizósfera en comparación al suelo sin cobertura vegetal.

**Tabla 3.** Valores promedio de los parámetros edáficos de los suelos usados para el montaje de los microcosmos. La significancia fue evaluada usando el análisis de varianza de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn ( $p < 0,05$ ). Las muestras que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas para la variable analizada ( $n = 7$ ).

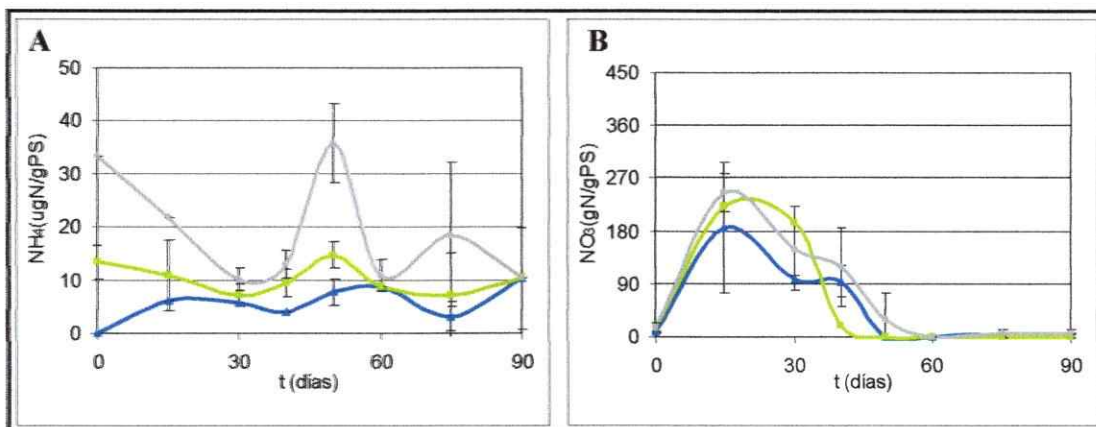
Tipo de suelo	% M.O	N disponible (mg kg <sup>-1</sup> )	P disponible (mg kg <sup>-1</sup> )	K disponible (mg kg <sup>-1</sup> )
Rizósfera actinorrónica	11.1 <sup>a</sup>	34 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>	430 <sup>a</sup>
Suelo sin cobertura	5.2 <sup>b</sup>	23 <sup>ab</sup>	41 <sup>b</sup>	284 <sup>a</sup>
Rizósfera no actinorrónica	9.5 <sup>ab</sup>	14 <sup>b</sup>	72 <sup>a</sup>	517 <sup>a</sup>

## 2. Perfiles de nitrato/amonio en los microcosmos (MC)

Para determinar las variaciones en los contenidos de amonio y nitrato en los MC contruidos con rizósfera (MCR) y suelo (MCS) se tomaron submuestras de los MC en los siguientes tiempos: 0, 15, 30, 40, 50, 60, 75 y 90 días de incubación. En suelos rizosféricos asociados a *C. hystrix* se observó una disminución en la concentración de amonio durante los primeros 30 días en las muestras tratadas con sulfato de amonio (Figura 4A y 4C). Luego de este tiempo se presentó un comportamiento cíclico similar en tendencia, tanto en los MC tratados como en el MC control. Por otra parte, se observó un aumento de nitrato durante los primeros 15 días del experimento (Figura 4B y 4D), seguido de una rápida disminución bajo los niveles de detección en todos los MC montados con muestras rizosféricas al día 60. Un comportamiento similar fue observado en MCR-NA25 (Figura 5A y 5B).

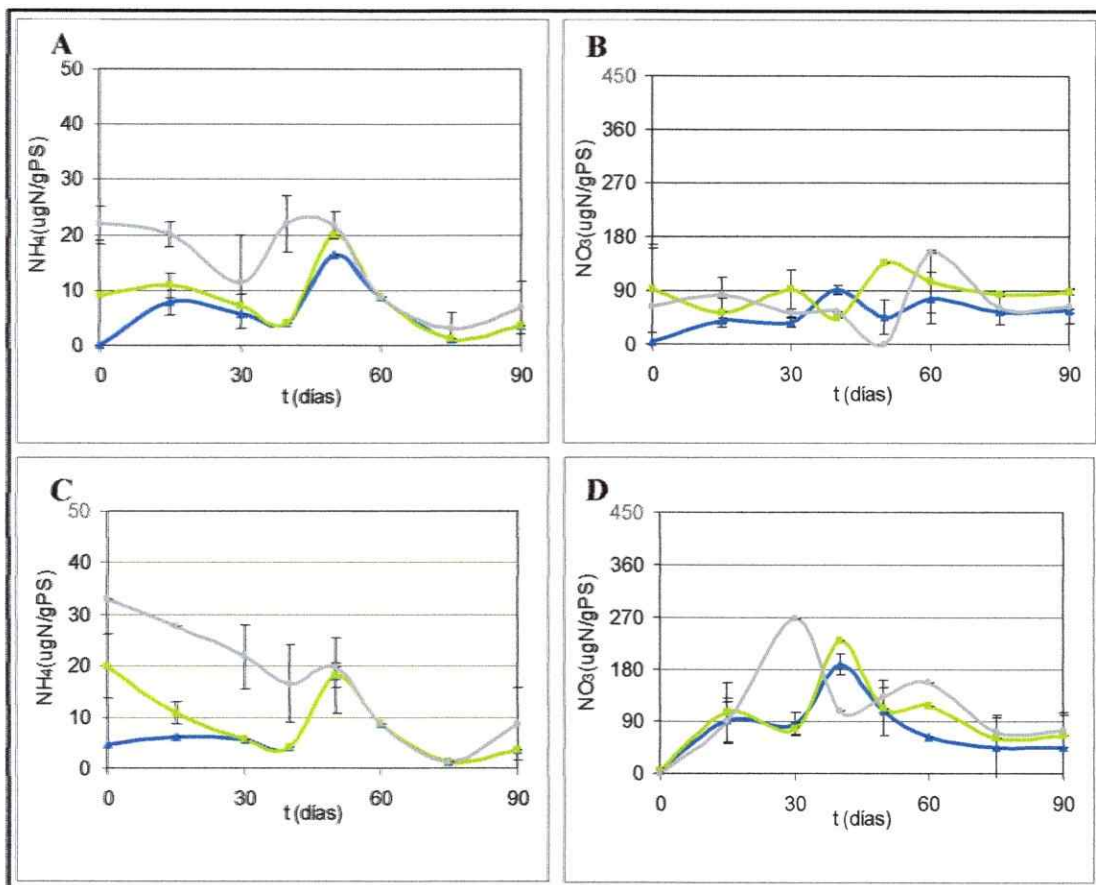


**Figura 4.** Contenido de amonio y nitrato de los MCR-Col4 y MCR-Col5. En gris se muestra el tratamiento de 400 ppm; en verde el tratamiento de 200 ppm; en azul el tratamiento con agua desionizada. **4A.** Contenido de amonio para MCR-Col4. **4B.** Contenido de nitrato para MCR-Col4. **4C.** Contenido de amonio para MCR-Col5. **4D.** Contenido de nitrato para MCR-Col5.



**Figura 5.** Contenido de amonio y nitrato de MCR-NA25. En gris se muestra el tratamiento de 400 ppm; en verde el tratamiento de 200 ppm; en azul el tratamiento con agua desionizada. **5A.** Contenido de amonio. **5B.** Contenido de nitrato.

En cuanto a los microcosmos contruidos en base a suelo sin cobertura vegetal, se pudo observar un comportamiento cíclico en las mediciones de amonio, similar al observado en los microcosmos rizosféricos (Figura 6A y 6C). Sin embargo la menor concentración de amonio se observa a los 40 días para la mayoría de los MCS excepto para MCS-1 suplementado con amonio 400 ppm, indicando que en general la disminución del amonio es más lenta en los MCS. Por otra parte el contenido de nitrato en estos MCS mostró variaciones cíclicas y no llegó a desaparecer durante el tiempo de medición (Figura 6B y 6D), en contraste a lo observado en los MCR. En general, en los MCS se observó que tanto la disminución de amonio como el aumento de nitrato durante la incubación fueron más lentos que la observada en los MCR.

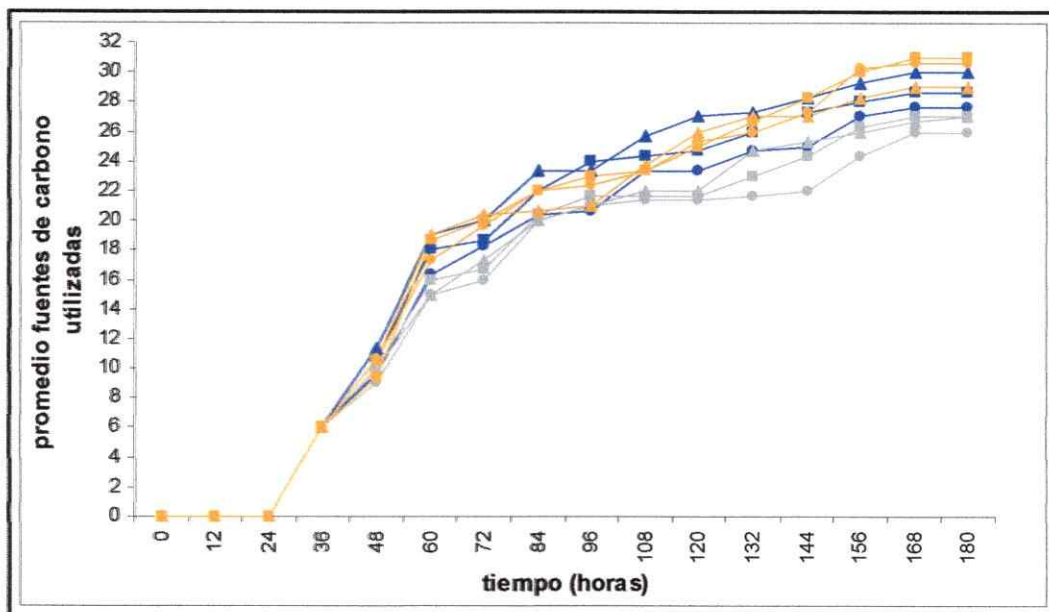


**Figura 6.** Contenido de amonio y nitrato de MCS-1 y MCS-5. En gris se muestra el tratamiento de 400 ppm; en verde el tratamiento de 200 ppm; en azul el tratamiento con agua desionizada. **6A.** Contenido de amonio para MCS-1. **6B.** Contenido de nitrato para MCS-1. **6C.** Contenido de amonio para MCS-5. **6D.** Contenido de nitrato para MCS-5.

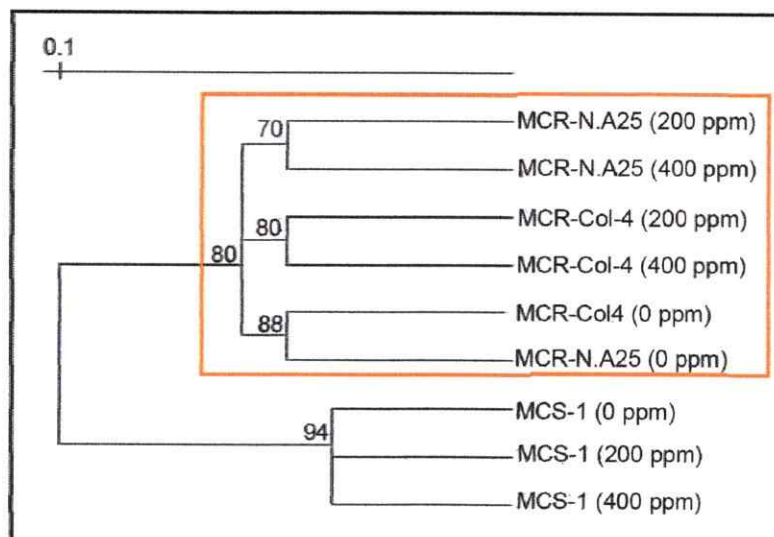


### 3. Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP)

Para evaluar si la adición de amonio afecta la diversidad metabólica de la comunidad bacteriana total de suelo y rizósfera, se determinaron los perfiles fisiológicos en tres microcosmos (MCS-1, MCR-CoI4 y MCR-NA25) tratados con tres concentraciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (0, 200 y 400  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e incubados durante 90 días a 20°C. La figura 7 muestra la diversidad metabólica de la comunidad total representada como el promedio de fuentes de carbono utilizadas por las distintas comunidades microbianas durante el tiempo de incubación del ensayo fisiológico (7 días a 27°C). Los perfiles de CMD muestran en primer lugar que la comunidad analizada está activa aún al día 90 de incubación, con esto se corrobora que los ensayos moleculares fueron hechos sobre una comunidad latente y no sobre células muertas. En términos del número promedio de fuentes de carbono utilizadas, todos los MC exhiben un valor similar al final del experimento. Sin embargo, al analizar el tipo de fuentes que estaban siendo consumidas por la comunidad bacteriana, mediante una matriz binaria de presencia/ausencia, hay una separación clara de los MCR y MCS, los cuales se agrupan entre sí con un *bootstrap* de 80% y 94%, respectivamente (Figura 8). Por otra parte, dentro de la rizósfera se observan tres subgrupos, separados en torno al tipo de suelo y tratamiento aplicado. Los MCR control regados únicamente con agua desionizada se separan del resto un 88% de las veces sin discriminar entre suelo no actinorrífico y actinorrífico. Al parecer, la adición de amonio permite diferenciar entre tipos de suelo, agrupando con 70% de *bootstrap* las muestras no actinorríficas tratadas con amonio y con un 80% las actinorríficas. Cabe destacar que las distancias entre las muestras es  $\leq 0,1$  por lo que hay una gran similitud entre ellas ya sea por tipo de suelo como por tratamiento aplicado.



**Figura 7.** Diversidad metabólica de la comunidad (CMD) a lo largo del tiempo para MCR-CoI4 (azul), MCS-1 (gris) y MCR-NA25 (naranja). Los círculos representan el tratamiento con 400 ppm de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , los cuadrados 200 ppm de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y los triángulos el tratamiento control con agua desionizada.



**Figura. 8.** Dendrograma de la comunidad microbiana construido en base a la presencia/ausencia de consumo de cada fuente de carbono del Biolog EcoPlate™. La similitud entre las muestras fue estimada con el índice Simple Matching y el algoritmo de agrupamiento UPGMA, usando el programa TREECON. El recuadro naranja indica la separación de las muestras rizosféricas.

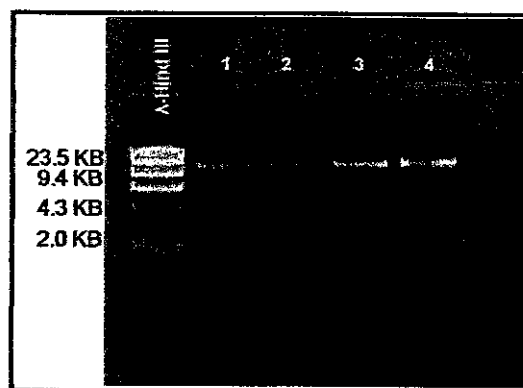
#### 4.- Análisis de la diversidad de las AOB presentes en los microcosmos

Para evaluar el efecto de la adición de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sobre la diversidad de las bacterias nitrificantes AOB se utilizó una aproximación molecular independiente de cultivo. La diversidad de este grupo funcional se evaluó directamente sobre la muestra de suelo o rizósfera a través del marcador molecular *amoA*.

##### 4.1 Extracción de DNA desde muestras de suelo

El DNA extraído a partir de los MC fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa como se muestra en la Figura 9. Se puede comprobar en el gel la integridad

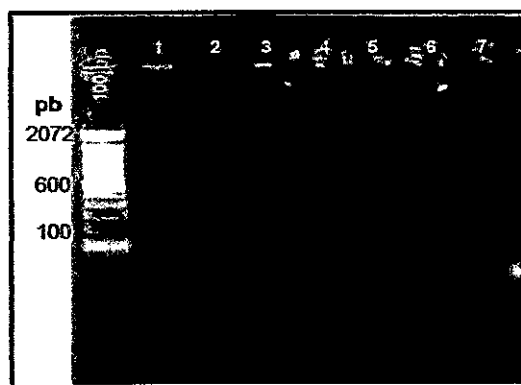
del DNA extraído, que hace que éste sea adecuado para la amplificación mediante PCR.



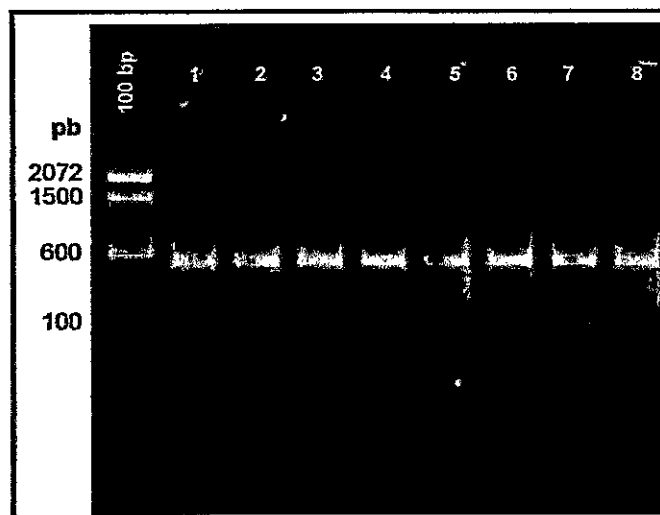
**Figura 9.** Electroforesis del DNA total extraído de los MC. El DNA fue resuelto por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Pocillo 1, MCR-CoI4 0 ppm t60; 2, MCS-5 200 ppm t60; 3, MCR-CoI4 0 ppm t90; 4, MCR-S5 200 ppm t90. Primer carril contiene el marcador molecular  $\lambda$ HindIII.

#### 4.2. Amplificación del gen *amoA* y perfiles de T-RFLP

La diversidad genética del gremio de oxidadores de amonio se evaluó en base a la diversidad del marcador funcional *amoA* amplificado mediante un PCR anidado. La correcta amplificación del gen fue evaluada en geles de agarosa al 1,2%. Se esperaba un fragmento de 800 pb en el primer PCR usando los partidores *amoA*-2F y *amoA*-5R (Webster et al, 2002) (Figura 10), sin embargo éste sólo se observó para *Nitrosospira briensis* (control positivo). Luego de la segunda reacción, usando los partidores *amoA*-1F y *amoA*-2R, se obtuvo un fragmento de 491 pb de acuerdo a lo esperado (Rotthawe et al, 1997). La Figura 11 muestra la amplificación luego de la segunda reacción de PCR usando el partidior forward marcado. Los tamaños esperados fueron comprobados luego de la reacción de PCR usando al marcador de peso molecular 100 bp ladder.

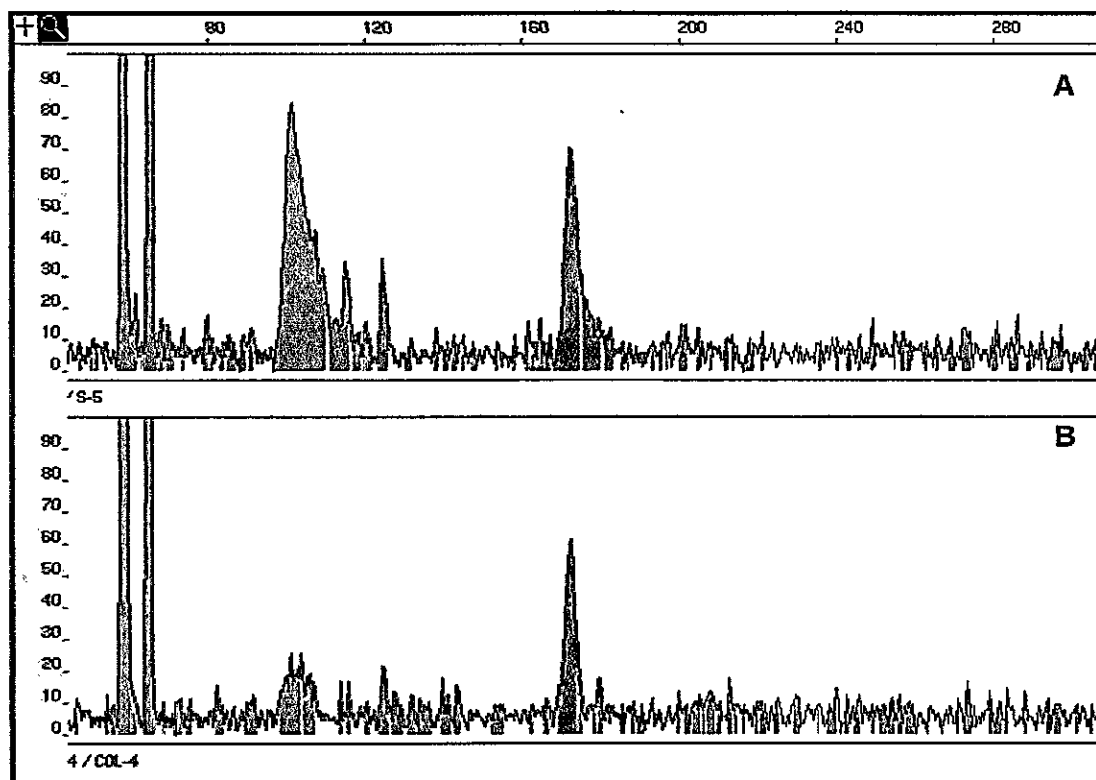


**Figura 10.** Electroforesis de los amplicones del gen *amoA* usando los partidores *amoA*-2F y *amoA*-5R verificado en un gel de agarosa al 1,2%. Pocillo: 1, MCR-Col4 0 ppm; 2, MCR-Col5 400 ppm; 3, MCS-1 0 ppm; 4, MCS-5 200 ppm; 5, MCR-NA25 400 ppm; 6, *N. briensis*, control (+); 7, Control (-). Todas las muestras fueron obtenidas a los 30 días de incubación.

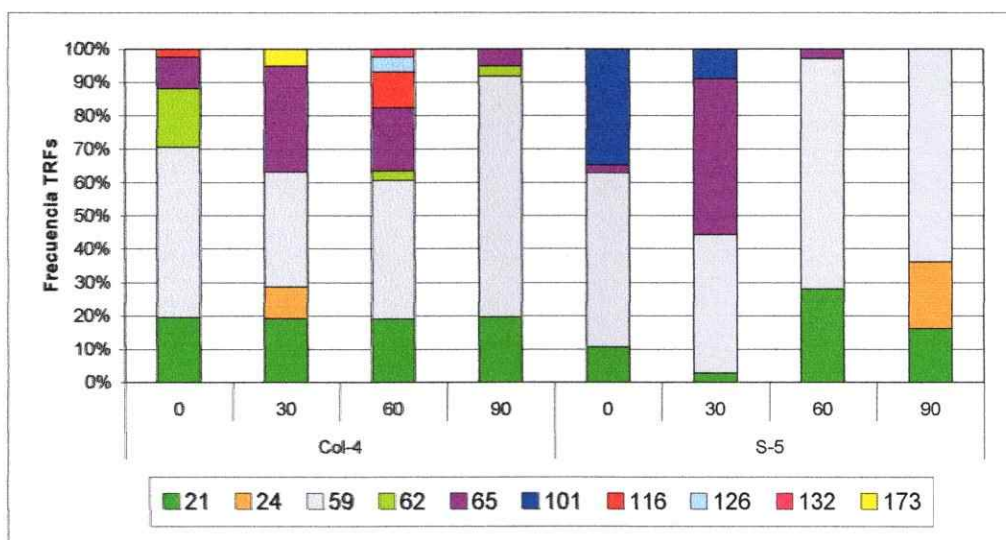


**Figura 11.** Resultado de la segunda amplificación del gen *amoA* usando los partidores *amoA*-1F y *amoA*-2R verificado en un gel de agarosa al 1,2%. Pocillo: 1, 2, 3, 4, MCR-Col4 0 ppm t60; 5, 6, 7, 8, MCS-5 200 ppm t60. Se verificó el tamaño esperado (491 bp) usando el marcador 100 bp.

Para la obtención de los perfiles de T-RFLP los amplicones de *amoA* fueron digeridos con la enzima de restricción *HhaI* como se ha descrito anteriormente (Mintie et al, 2003; Bottomley, 2004; Yeager et al, 2005). La Figura 12 muestra uno de los electroferogramas obtenidos para MCR-Col4 0 ppm y MCS-5 200 ppm a los 30 días de incubación. En general se observa que la fluorescencia está concentrada entre 4-6 fragmentos terminales de restricción (TRFs) en el perfil de T-RFLP. Cuando los datos se analizan en término de presencia de TRFs (riqueza) y fluorescencia relativa (abundancia), en función del tiempo de incubación, se observan algunas diferencias en cuanto a la composición de cada muestra. La Figura 13 muestra los principales TRFs obtenidos durante la incubación de MCS-5 tratado con amonio y MCR-Col4 usado como control no tratado. Los resultados muestran un patrón de unos pocos TRFs que se mantiene durante todo el experimento, siendo algunos de ellos comunes en ambos tipos de MC. Por ejemplo, el fragmento terminal (TRF) de 59 pb es común en ambos microcosmos y es abundante durante todo el período de incubación, independiente del tratamiento con amonio. Este fragmento terminal pudo identificarse en la base de datos como *Nitrosomonadales* (Tabla 4). Por otra parte, se observan diversos TRFs con menor representación pero que aparecen en suelo y rizósfera, como el de 21 pb y el de 65 pb que fueron asociados a *Nitrospira*. Por el contrario, el TRF de 101 pb, que fue encontrado sólo en suelo, no pudo ser asociado a ningún género conocido de oxidadores de amonio. Del mismo modo, los TRFs de 62 pb, 116 pb, 132 pb y 173 pb están presentes sólo en el MC de rizósfera.



**Figura 12.** Electroferogramas obtenidos para los T-RFLP de *amoA* para muestras de DNA de los microcosmos al tiempo 30 de: **12.A.** MCS-5 200 ppm; **12.B.** MCR-CoI4 0 ppm.



**Figura 13.** Frecuencia acumulada de los principales TRFs del gen *amoA* en MCR-Col4 0 ppm y MCS-5 200 ppm a los 0, 30, 60 y 90 días de incubación. Cada color indica el tamaño del fragmento terminal en pares de bases.

**Tabla 4.** Asociación de TRFs obtenidos para el gen *amoA* a géneros de oxidadores de amonio en la base de datos del GeneBank.

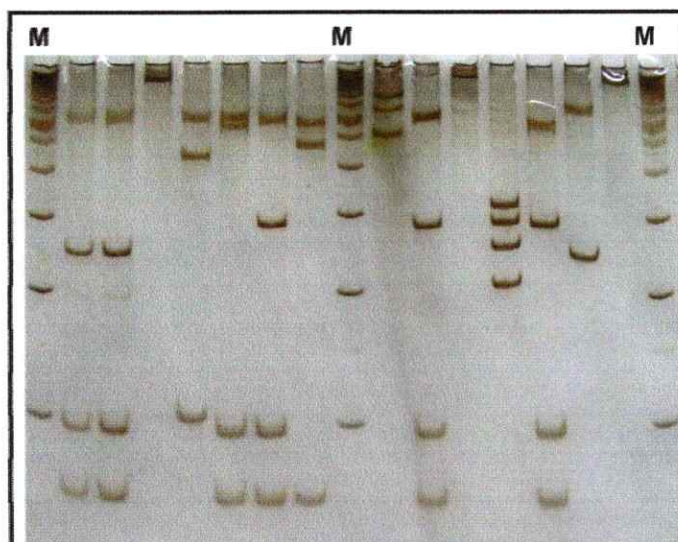
Tamaño (pb)	Grupo relacionado
21	<i>Nitrosospira</i>
24	<i>Nitrosospira</i>
59	<i>Nitrosomonadales</i>
62	<i>Nitrosomonadales</i>
65	<i>Nitrosospira</i>
101	No identificado
116	<i>Nitrosospira</i>
126	<i>Nitrosospira</i>
132	<i>Nitrosospira</i>
173	<i>Nitrosospira</i>



### 4.3. Clonación y Secuenciación

La composición del gremio de bacterias oxidadoras de amonio fue determinada mediante la clonación y secuenciación del gen funcional *amoA*. El DNA obtenido de los MCS-5 y MCR-Col4 se utilizó como templado para amplificar el gen *amoA*. La mezcla de amplicones fue ligada al vector pCRII y clonada en *E. coli* DH5 $\alpha$ . La diversidad de clones fue determinada mediante un patrón del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima *HhaI*. En la Figura 14 se muestra el patrón de RFLP de algunos clones. Los clones con diferentes RFLP fueron secuenciados para identificar los géneros de AOB presentes en los MC. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa BLASTN (Tabla 5). El 100% de los clones analizados se relacionaron con especies del género *Nitrosospira* con una identidad entre el 93-98%. La secuencia más relacionada con cada clon obtenido corresponde a bacterias oxidadoras de amonio no-cultivadas (Tabla 5).

El análisis filogenético de las secuencias de los clones permite separarlos en dos grupos distintos (Figura 15). El primero comprende Col-4.1, Col-4.2, Col-4.3, Col-4.4, Col-4.5 y S-5.1, S-5.2, S-5.3, S-5.5 y S-5.6; y el segundo comprende sólo clones obtenidos a partir de suelo sin cobertura vegetal. En términos generales todos los clones se relacionan con organismos del género *Nitrosospira* y *Nitrosomonadales*, estos resultados concuerdan con lo encontrado mediante el análisis de T-RFLP.



**Figura 14.** Análisis de la diversidad de clones del gen *amoA*. Los patrones de RFLP de cada clon se determinaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, teñidos con nitrato de plata. Cada pocillo corresponde a un clon diferente. Con M se muestran los pocillos que contienen el marcador de peso molecular 100 bp.

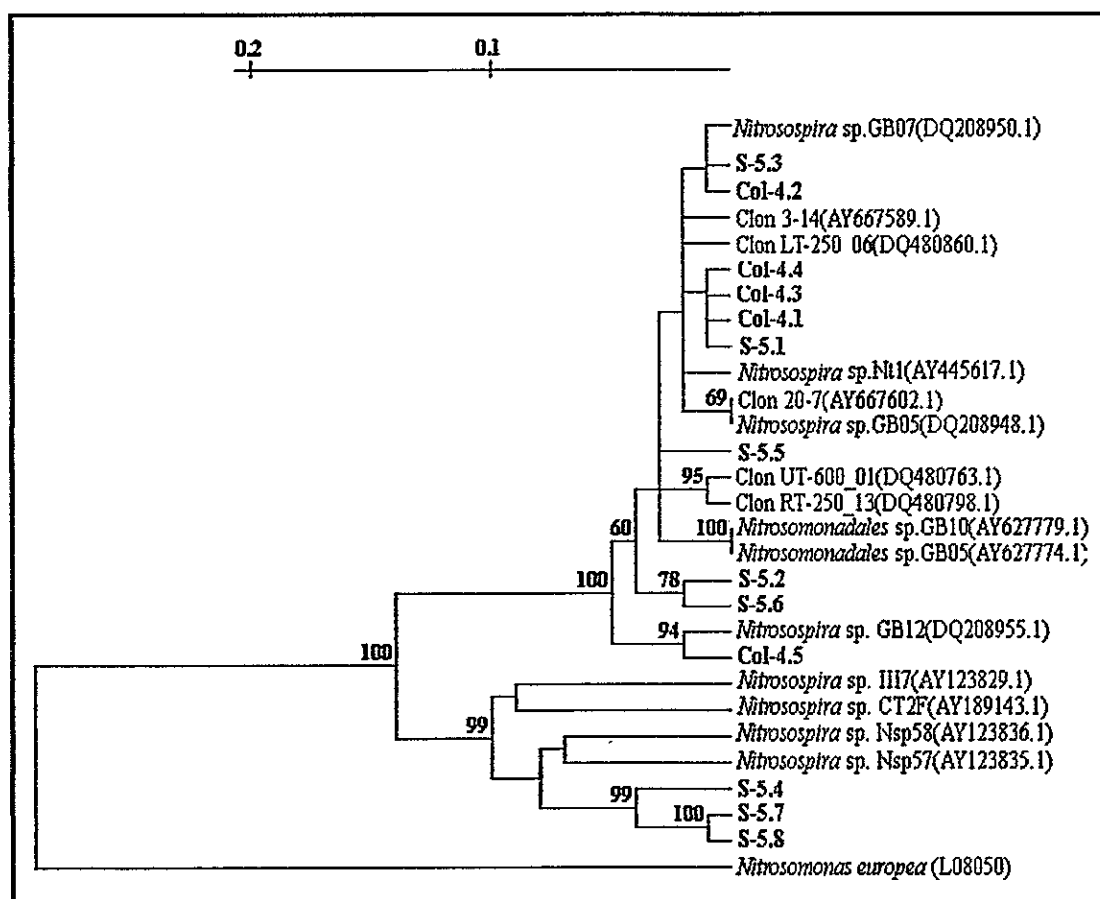
**Tabla 5.** Identificación de los clones de *amoA* usando el programa BLASTN en NCBI.

Nombre clon	Secuencia más relacionada*	% identidad	Nº acceso	Organismo más relacionado**	% identidad	Nº acceso
Col-4.1	B.N.C. <sup>1</sup>	98	DQ480860.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	98	AY445617.1
Col-4.2	B.N.C	98	AY667589.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	98	AY445617.1
Col-4.3	B.N.C	98	DQ480860.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	98	AY445617.1
Col-4.4	B.N.C	98	DQ480860.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	98	AY445617.1
Col-4.5	B.N.C	97	AY667595.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	95	AY445617.0
S-5.1	B.N.C	98	DQ480860.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	98	AY445617.1
S-5.2	B.N.C	97	AY667589.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	97	AY445617.1
S-5.3	B.N.C	97	AY667589.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	97	AY445617.1
S-5.4	B.N.C	93	AY249656.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	93	AY123836.1
S-5.5	B.N.C	97	AY667589.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	97	AY445617.1
S-5.6	B.N.C	97	AY667589.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	97	AY445617.1
S-5.7	B.N.C	93	AY249656.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	93	AY123836.1
S-5.8	B.N.C	93	AY249656.1	<i>Nitrosospira sp.</i>	93	AY123836.1

\* Primera secuencia obtenida en el BLAST.

\*\* Primera secuencia en el BLAST que corresponde a una bacteria descrita.

<sup>1</sup> B.N.C: bacteria no cultivada.



**Figura 15.** Relaciones filogenéticas del gen *amoA* de clones ambientales obtenidos a partir de muestras de los MC de suelo y rizósfera. Las distancias se obtuvieron con el índice Jukes & Cantor y se infirió la topología del árbol usando el algoritmo de distancia UPGMA con un bootstrap sobre 100 réplicas (programa TREECON). Entre paréntesis se dan los números de acceso de las secuencias de referencia. Se muestran los bootstrap con valores sobre 50.

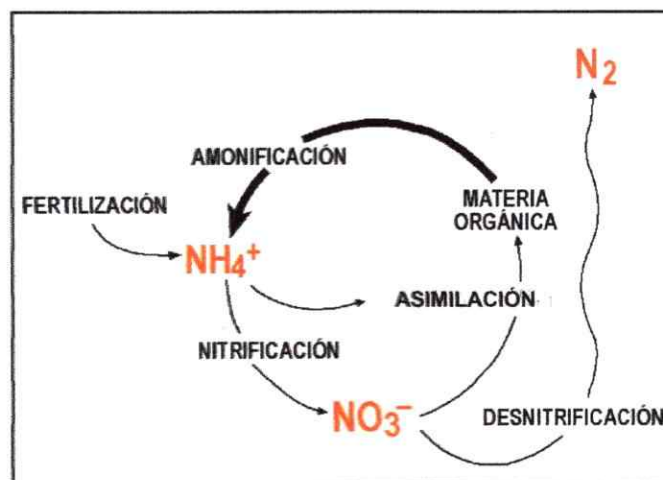
## DISCUSIÓN

### **1. Variación de la concentración de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ en los microcosmos y su relación con los grupos funcionales del nitrógeno**

Los resultados muestran que durante los primeros 15 días se observa actividad nitrificante con producción de nitrato, el cual disminuye rápido en la rizósfera y más lentamente en el suelo sin cobertura vegetal, posiblemente por efecto de desnitrificación. El aumento de nitrato durante los primeros tiempos de incubación es coincidente con la disminución de amonio durante el mismo periodo, indicando que hay una actividad de nitrificación que promueve esta transformación. Posteriormente, el nitrato disminuye hasta niveles no detectables. Esta disminución del nitrato podría ocurrir por actividad desnitrificante tanto asimilatoria como desasimilatoria, esta última se favorece en condiciones de anaerobiosis, la cual podría alcanzarse en los últimos tiempos de incubación de los microcosmos. Asimismo, esta disminución de oxígeno reduce la actividad de los nitrificadores (Niklaus et al, 2001). Investigaciones anteriores muestran que la adición de concentraciones medias (58 ppm) y altas (395 ppm) de amonio al suelo estimula el crecimiento de las poblaciones de desnitrificadores (Avrahami et al, 2002).

Otra observación de interés en los MC fue el comportamiento cíclico del amonio durante el tiempo de incubación. En el ciclo del nitrógeno el amonio se forma a partir de: a) fijación de nitrógeno molecular, b) reducción del nitrito y c) amonificación de la materia orgánica. La fijación de  $\text{N}_2$  es improbable que ocurra en los MC ya que hay nitrógeno combinado en el suelo que inhibe este proceso. Por su parte, la reducción de

nitrate to ammonium would be reduced because nitrate levels decrease rapidly in the rhizosphere. Therefore, given the characteristics of the microcosms, the subsequent increase in ammonium that accounts for the cyclic behavior, could be due primarily to the process of nitrification of the organic matter present in the system. Mednum et al (1999) observed that after the addition to the soil of a fertilizer containing ammonium, nitrifying activity was observed in the initial times, which returned to the initial values after a few weeks. It is important to note that the cyclic behavior is out of phase when comparing the rhizosphere (Figures 4 and 5) and soil without cover (Figure 6), which could be due during the first times to a lower bacterial abundance in the latter, and then to differences in the organic matter content and therefore in the nitrification rate. In Figure 16 the possible dynamics followed by the nitrogen cycle during the experiment are shown.



**Figura 16.** Ciclo del Nitrógeno resultante en los MC. La flecha gruesa indica el proceso dominante.

## 2. CLPP y respuesta metabólica de la comunidad a la adición de amonio

Marshall (1993) define dentro de los objetivos principales de la ecología microbiana para entender el papel de los microorganismos en el ambiente, 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.

La diversidad metabólica de la comunidad (DMC) representa el número de sustratos utilizados por la comunidad y es análogo a la riqueza funcional. La presencia de color representa la actividad metabólica dada por la dominancia numérica de especies bacterianas (Konopka et al, 1999). Según este parámetro es posible afirmar que a los 90 días de incubación, tanto el suelo sin cobertura como la rizósfera sometida a las condiciones descritas para el microcosmo, tienden a homogenizarse en términos de número de individuos metabólicamente activos (Figura 7). Sin embargo, el análisis multivariado de cluster, el cual permite cuantificar las diferencias entre las muestras,

indica que si bien las muestras son similares en cuanto a número de individuos, se diferencian en el tipo de fuentes utilizadas (Figura 8). Este análisis permite discriminar por tipo de muestra la comunidad bacteriana. Cabe mencionar en este punto que las Ecoplacas usadas en este experimento, fueron diseñadas para aplicaciones ecológicas y comprenden 31 susstratos de los cuales 9 constituyen exudados de raíces (Preston-Mafham et al, 2002), lo que las hace especialmente sensibles en la discriminación de muestras rizosféricas respecto a suelo sin cobertura vegetal. Por otra parte, también se observó en los resultados que dentro del grupo de la rizósfera, se forman tres subgrupos: muestras tratadas sólo con agua, muestras actinorrícicas tratadas con amonio y muestras no actinorrícicas tratadas con amonio. Esto sugiere que el amonio juega un papel importante en la diferenciación de la comunidad bacteriana total, efecto que actúa en forma diferencial sobre la rizósfera actinorrícica y no actinorrícica. Sin embargo, es importante notar que la distancia entre las muestras es menor a 0,1, lo que implica gran similitud entre éstas, por lo que las diferencias observadas que permiten el agrupamiento son mínimas, dando cuenta de la sensibilidad del análisis.

### **3. Efecto del amonio sobre la diversidad de bacterias oxidadoras de amonio**

Los perfiles de T-RFLP obtenidos para el gen *amoA* revelan gran similitud entre suelo sin cobertura vegetal y rizófera, con y sin amonio. Se observan algunos TRFs dominantes presentes en ambas muestras durante toda la incubación, y otros minoritarios que aparecen sólo en algunos tiempos, pero cuya frecuencia relativa es mínima al compararlo con los antes mencionados (Figura 13). Resultados previos indican que las bacterias oxidadoras de amonio responden ante la fertilización del suelo con nitrato de amonio tardíamente, variando su tamaño poblacional sin

observarse diferencias en la composición del gremio. Este aumento poblacional no se relacionó con el aumento de la actividad de nitrificación (Mednum et al, 1999). Antecedentes bibliográficos previos muestran que los patrones de DGGE de *amoA* (que representan la variabilidad genética del gremio bacteriano) permanecen invariables entre muestras de suelo tratadas con diferentes concentraciones de amonio y el control, en contraste con las variaciones observadas en la actividad de nitrificación (Avrahami et al, 2002). En concordancia con estos antecedentes, no es raro encontrar tan baja variabilidad en los patrones de T-RFLP en los MC estudiados y que la actividad nitrificante ocurra sólo durante los primeros tiempos de incubación. Las AOB parecen responder rápidamente a cambios en el ambiente aumentando su actividad metabólica sin generar cambios en la composición del gremio, ésta se modificaría después de tratamientos mantenidos por largo tiempo, debido a su largo tiempo generacional (Kowalchuk & Stephen, 2001). De acuerdo a esto sería esperable encontrar cambios en la abundancia relativa de las AOB sólo en los últimos tiempos de incubación de los microcosmos.

Por otra parte, algunos autores indican que la concentración de amonio, la concentración de oxígeno y el pH serían los parámetros ambientales que más afectan la actividad y diversidad de la comunidad nitrificadora (Princic et al, 1998). De acuerdo a nuestros datos, la adición de amonio no parece tener mayor efecto en la abundancia de las AOB en los microcosmos analizados, de acuerdo a los patrones de T-RFLP observados. Esta ausencia de efecto podría estar dada porque los microcosmos podrían estar respondiendo a otros parámetros ambientales como la adición de agua que reduciría el estrés hídrico más que a la adición de amonio. Observaciones



similares fueron hechas por Horz et al (2004) al observar que las AOB responden a un aumento moderado de la humedad del suelo al reducir el estrés hídrico.

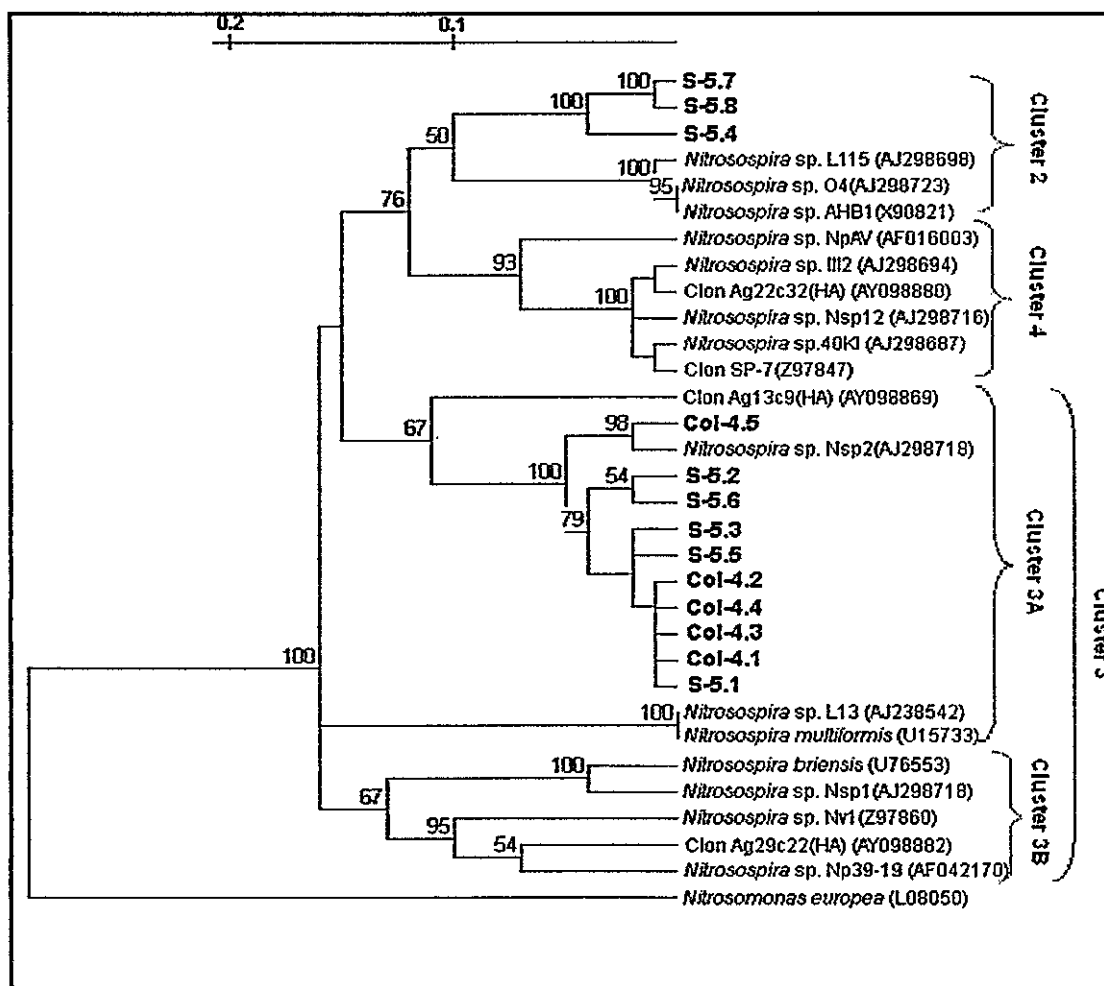
La bibliografía informa que la fertilización de los suelos con nitrógeno tiende a disminuir la diversidad del gremio de oxidadores de amonio (Bruns et al, 1999). Al respecto los MC estudiados en general presentan pocos TRFs para los oxidadores de amonio y esto es más notorio en los tiempos finales de incubación. Este menor número de TRFs podría ser consecuencia de las condiciones de temperatura y riego bajo las cuales se mantuvieron los microcosmos que influirían en la homogenización de las muestras.

La mayoría de los TRFs observados pudieron ser identificados en la base de datos, y se asocian a *Nitrosomonadales* y *Nitrospira* (Tabla 4). Estos datos son coherentes con lo encontrado en la literatura que da cuenta de que en el suelo existe dominancia de *Nitrospira* sobre *Nitrosomonas* (Mednum et al, 1999; Kowalchuk & Stephen, 2001; Avrahami et al, 2002).

El estudio de los clones de *amoA*, mostró que los 70 clones obtenidos se agruparon en 13 grupos distintos de acuerdo al análisis de RFLP (Figura 14). El análisis de la secuencia muestra que los clones se distribuyen en sólo dos grupos con gran similitud (distancia menor a 0,2). Estos grupos están estrechamente relacionados con organismos del género *Nitrospira* (Figura 15, Tabla 5). La dominancia de secuencias relacionadas con *Nitrospira* es acorde con la amplia distribución observada para este género en ambientes terrestres (Whitby et al, 2001).

Por otra parte, es importante destacar que ningún clon se asocia con bacterias o secuencias del género *Nitrosomonas*, otro género de bacterias nitrificantes descritas en variedad de ambientes tales como lagos (Whitby et al, 2001), sedimentos marinos (Stephen et al, 1996; Kowalchuc & Stephen, 2001) y también en diversos tipos de suelos (Stephen et al, 1996; Bothe et al, 2000; Kowalchuc et al, 2000; Kowalchuc & Stephen, 2001). Sin embargo, estudios previos sugieren que en el suelo hay una dominancia de *Nitrospira* sobre *Nitrosomonas* (Kowalchuc & Stephen, 2001; Whitby et al, 2001).

Según la clasificación de los oxidadores de amonio en cuanto a las secuencias de su 16S rRNA de Purkhold et al (2000), la mayoría de los clones obtenidos en este trabajo se agrupan dentro del cluster 3A, mientras la fracción minoritaria queda dentro del cluster 2 (Figura 17). Las AOB del cluster 3A se describen como bacterias nitrificantes que dominan en estados sucesionales tempranos, en suelos fertilizados con altas concentraciones de amonio y pH neutro. Por el contrario, los oxidadores de amonio del cluster 2 se han encontrado en suelos ácidos con bajas cantidades de amonio, y durante estados sucesionales tardíos.



**Figura 17.** Relaciones filogenéticas el gen *amoA* de clones ambientales obtenidos a partir de muestras de los MC de suelo y rizósfera. Las distancias se obtuvieron con el índice Jukes & Cantor y se infirió la topología del árbol usando el algoritmo UPGMA con un bootstrap de 100 (programa TREECON). Las secuencias son separadas de acuerdo a la clasificación de Purkhold (2000). Entre paréntesis se dan los números de acceso de las secuencias de referencia. Se muestran los bootstrap sobre 50.

## CONCLUSIONES

1. La adición de amonio a los diferentes tipos de suelos estudiados afectó no sólo la actividad nitrificante sino también la actividad desnitrificante.
2. El aumento en la actividad nitrificante no estuvo asociado a un cambio en la composición del gremio de bacterias oxidadoras de amonio.
3. En todos los microcosmos se observó similar actividad nitrificante en los primeros tiempos de incubación. Sin embargo, el nitrato producido fue desnitrificado más rápido en los microcosmos asociados a rizósfera que en los derivados de suelo sin cobertura vegetal.
4. El comportamiento cíclico del amonio podría explicarse por los procesos de amonificación y asimilación de nitrógeno combinado.
5. Las comunidades microbianas de las rizósferas fueron metabólicamente más activas que las del suelo sin cobertura vegetal y difirieron en las fuentes de carbono utilizadas.
6. Los fragmentos terminales (TRFs) de 21 pb y 59 pb estuvieron entre los más abundantes y fueron comunes a todos los microcosmos estudiados. El análisis *in silico* indicó que estos TRFs corresponderían a *Nitrosospira* y *Nitrosomonadales* respectivamente.

7. Los clones del gen *amoA* predominantes en los microcosmos presentaron alta identidad de secuencia con *Nitrospira* y *Nitrosomonadales*.

## REFERENCIAS

- Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Atlas R.M. & R. Bartha. 2002. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4ta ed. Pearson. Madrid, España. 677 pp.
- Avrahami, S., R. Conrad, and G. Braker. 2002. Effect of soil ammonium concentration on N<sub>2</sub>O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5685-5692.
- Bernhard A.E., T. Donn, A.E. Giblin and D.A. Stahl. 2005. Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environmental Microbiology* 7: 1289-1297.
- Bottomley P.J., A.E. Taylor, S.A. Boyle, S.K. McMahon, J.J. Rich, K. Cromack Jr. and D.D. Myrold. 2004. Responses of Nitrification and Ammonia-Oxidizing Bacteria to Reciprocal Transfers of Soil between Adjacent Coniferous Forest and Meadow Vegetation in the Cascade Mountains of Oregon. *Microbial Ecology* 48: 500-508.
- Bothe H., G. Jost, M. Schloter, B.B. Ward, K.P. Witzel. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 673-690.
- Bruns MA, J.R. Stephen, G.A. Kowalchuk, J.L. Prosser, E.A. Paul. 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2994-3000.
- Carú M., G. Mosquera, L. Bravo, G. Guevara, D. Sepúlveda and A. Cabello. 2003. Infectivity and effectivity of *Frankia* strains from the Rhamnaceae family on different actinorhizal plants. *Plant & Soil* 251: 219-225.
- Chávez M. & M. Carú. 2006. Genetic Diversity of *Frankia* microsymbionts in root nodules from *Colletia hystrix* plants by sampling at a small-scale. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 813-820.
- Calbrix R., L. Laval, S. Barry. 2005. Analysis of the potential functional diversity of the bacterial community in soil: a reproducible procedure using sole-carbon-source utilization profiles. *European Journal of Soil Biology* 41: 11-20.
- De Boer W. & G.A. Kowalchuk. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 853-866.
- Foster J.C. 1995. Soil Nitrogen. En: K. Alef & P. Nannipieri (Eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press Inc. San Diego, CA. pp. 79-87.

- Garland J.L.** 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 289-300.
- Galloway, J.N., J.D. Aber, J.W. Erisman, S.P. Seitzinger, R.W. Howart, E.B. Cowling and B. J. Cosby.** 2003. The Nitrogen Cascade. *BioScience* 53:341-356
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Horz H.P., A. Barbrook, C.B. Field and B.J.M. Bohannon.** 2004. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *PNAS* 101: 15136-15141.
- Jukes, T. H. & C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules. H. N. Munro, ed., *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Konopka A., L. Oliver, and R.F. Turco.** 1999. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. *Microbial Ecology* 35: 103-115.
- Kowalchuk G.A., A.W. Stienstra, G.H.J Heilig, J.R. Stephen and J.W. Woldendorp.** 2000. Composition of communities of ammonium-oxidising bacteria in wet, slightly acid grassland soils using 16S rDNA-analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 207-215.
- Kowalchuk G.A. & J.R. Stephen.** 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review Microbiology* 55: 485-529.
- Liu, W-T., T.L. Marshi, H. Cheng and L.J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522.
- Madigan, M., J. Martinko, Parker, J.** 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8th edition. Prentice Hall Iberia. Madrid. pp. 497-499.
- Marsh, T.L. Saxman, P. Cole, J. and Tiedje, J.** 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3616-3620.
- Marshall, K.C.** 1993. Microbial ecology: Whither goest thou?. *Trends in Microbial Ecology*. Spanish Society for Microbiology, Barcelona, pp.5-8.
- Mednum T.A., R.E. Sockett & P.R. Hirsch.** 1999. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the beta subdivision of the class proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4155-4162.
- Mintie A.T., R. S. Heichen, K. Cromack, Jr., D. D. Myrold, and P. J. Bottomley.** 2003. Ammonia-Oxidizing Bacteria along Meadow-to-Forest Transects in the Oregon Cascade Mountains. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3129-3136.

**Nicolaisen M. and N. Ramsing.** 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 50: 189-203.

**Niklaus, P.A., E. Kandeler, P.W. Leadley, Schmid, B., Tscherko, D. and C. Korner.** 2001. A link between plant diversity, elevated CO<sub>2</sub> and soil nitrate. *Oecologia* 127: 540-548.

**Norton, J.M., Alzerreca, J.J., Suwa, Y., Klotz, M.G.** 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology* 177: 139-149.

**Okano, Y., K.R. Hristova, C.M. Leutenegger, L.E. Jackson, R.F. Denison, B. Gebreyesus, D. LeBauer, and K.M. Scow.** 2004. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on the population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1008-1016.

**O'Mullan G.D and B. B. Ward.** 2005. Relationship of Temporal and Spatial Variabilities of Ammonia-Oxidizing Bacteria to Nitrification Rates in Monterey Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 697-705.

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

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

**Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.P. Koops and 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. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5368–5382.

**Risgaard-Petersen N., M.H. Nicolaisen, N.P. Revsbech, B.A. Lomstein.** 2004. Competition between ammonia-oxidizing bacteria and benthic microalgae. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5528-5537.

**Rotthauwe J.H., K.P. Witzel and W.Liesack.** 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4704-4712.

**Schwencke, J. and Carú, M.** 2001. Advances in Actinorhizal symbioses. Biology of Frankia. host-plant interactions and applications in arid land reclamation. *Arid Land Research and Management* 15: 285-327.



**Stephen, J.R., A.E. McCaig, Z. Smith, J.I. Prosser and T.M. Embley.** 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to  $\beta$ -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4147–4154.

**Van de Peer Y. and R. De Wachter.** 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computers Application in the Biosciences* 10: 569-570.

**Vitousek P.M. and R.W. Howarth.** 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur?. *Biogeochemistry* 13: 87-115

**Webster, G., T. M. Embley, and J. I. Prosser.** 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of  $\beta$ -proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 20–30.

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

**Wolters V., W.L. Silver, D.E Bignell, D.C Coleman, P. Lavelle , et al.** 2000. Effects of global changes on above-and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: Implications for ecosystem functioning. *Bioscience* 50: 1089-1098.

**Yeager C.M., D.E. Northup, C.C. Grow, S.M. Barns and C.R. Kuske.** 2005. Changes in Nitrogen-Fixing and Ammonia-Oxidizing Bacterial Communities in Soil of a Mixed Conifer Forest after Wildfire. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2713-2722.