UCH-FC
Biotecnología
QT483
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

"DIVERSIDAD DE ARQUEAS OXIDADORAS DE AMONIO Y SU APORTE AL PROCESO DE NITRIFICACIÓN EN EL SUELO SEMIÁRIDO DEL MATORRAL ESCLERÓFILO DE CHILE"

Seminario de Título

entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS
BIBLIOTECA CENTRAL
U. DE CHILE

Por
VALENTINA ALEJANDRA VERDEJO PARADA

Agosto, 2010
Santiago – Chile

Directora de Seminario de Título: Dra. Margarita Carú Marambio
Co-directora de Seminario de Título: Dra. Julieta Orlando

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta:

VALENTINA ALEJANDRA VERDEJO PARADA

"Diversidad de arqueas oxidadoras de amonio y su aporte al proceso de nitrificación en el suelo semiárido del matorral esclerófilo de Chile"

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. Margarita Carú Marambio
Directora Seminario de Título

Dra. Julieta Orlando
Co-Directora

Comisión de Evaluación

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Presidente

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Evaluador

FACULTAD DE CIENCIAS – U. DE CHILE – BIBLIOTECA CENTRAL

Santiago de Chile, agosto de 2010

RESEÑA

FACULTAD DE CIENCIAS
BIBLIOTECA CENTRAL
U. DE CHILE

Mi nombre es Valentina Alejandra Verdejo Parada, nací dentro de una familia que, a pesar de no ser numerosa, fue y sigue siendo muy unida. Toda mi escolaridad la realicé en el Colegio La Girouette, mi segundo hogar, donde tuve la oportunidad de aprender un idioma hermoso además de una cultura fascinante, y más importante aún me brindaron una formación basada en el respeto, la tolerancia y la conciencia. Al momento de salir del colegio mi interés por estudiar Ciencias fue claro y siempre apoyada por mis padres, decidí estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Mi educación superior la realicé en la Universidad de Chile, en la facultad de Ciencia, lugar donde tuve el privilegio de conocer a personas muy valiosas tanto en el ámbito docente como fraterno, me siento afortunada de la formación que recibí y de los amigos que tengo. Soy una agradecida de todos los recuerdos y experiencias que he vivido.

FACULTAD DE CIENCIAS
BIBLIOTECA CENTRAL
U. DE CHILE

Para mi mami

FACULTAD DE CIENCIAS
BIBLIOTECA CENTRAL
U. DE CHILE

AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir mis agradecimientos nombrando a mi profe, Dra Margarita Carú, porque me aceptó en su laboratorio, lugar de trabajo y de muy buenos momentos y recuerdos; le agradezco por los consejos, el tiempo y buena disposición que tuvo conmigo todo el tiempo que estuve en el laboratorio. Chiquillos del lab!!! Agradezco a todos los "antiguos", Cata, José, Juanita -La Reina-, Feña, Julieta, Felipe -el grumete-, Nati, Marisol, Gabriel, Mauro porque de alguna u otra manera me ayudaron, enseñándome y siendo cómplice de las innumerables "crónicas", acogiéndome, aconsejándome y guiándome; "El capitán" les agradece toda la buena onda, los exquisitos cumpleaños y por supuesto haber sido parte de la mejor hinchada "La MicroGarra". Y a los "nuevos" también por todos los buenos momentos, las risas compartidas y el cariño: Marjo, Merly, Cami y Madelaine muchas gracias.

Mis queridísimas amigas de la vida "Las K", no puedo olvidarlas, a pesar del tiempo siempre han sido un apoyo importante para mi. A mis amigos y compañeros de la U (totó por supuesto que estás incluida) por todo el tiempo juntos, ya sea en clases, kiosko, en algún lugar remoto y espectacular, en la casa de la sofi/morocco/jaime, siempre conmigo (o yo con Uds). Carlos, Natty, Crema, Lucho, Nico y Jaime muchas gracias amigos míos.

Finalmente agradezco a mi hermosa familia mis tías, primas, mamina, papi, mi tío Juan, Martita, todos ustedes son un pilar fundamental en mí, desde siempre conmigo y apoyándome en todo; particularmente quiero agradecerle a mi mamá por su incansable apoyo, infinito cariño y sabias palabras. Otra persona, parte de mi familia, que quiero agradecer en especial es a Nacho, por su amor incondicional y compresión, este ha sido un proceso que hemos superado juntos.

Este seminario de título fue realizado gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT 1080280

FACULTAD DE CIENCIAS
BIBLIOTECA CENTRAL
U. DE CHILE

LISTA DE MATERIAS

RESEÑA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE MATERIAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1.- INTRODUCCIÓN	**1**
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	**12**
2.1. Recolección de muestras	12
2.2 Diseño y montaje de los microcosmos	12
2.3 Determinación de los parámetros fisicoquímicos	13
2.3.1 Contenido de nitrato y amonio	*13*
2.3.2 Medición de pH	*14*
2.4 Diversidad Genética del gremio de oxidadores de amonio	15
2.4.1 Extracción de DNA	*15*
2.4.2 Amplificación por PCR	*15*
2.4.2.1 Amplificación del gen amoA de arqueas	*15*
2.4.2.2 Amplificación del gen amoA de bacterias	*16*

FACULTAD DE CIENCIAS
BIBLIOTECA CENTRAL
U. DE CHILE

2.4.3 NMP-PCR 17

2.4.4 Clonación y secuenciación 18

2.4.5 Análisis filogenético de secuencias 19

2.4.6 Perfiles de T-RFLP 20

2.4.7 Estandarización y análisis de los perfiles de T-RFLP 21

3.-RESULTADOS **22**

3.1 Efecto del agua y el acetileno sobre la actividad de nitrificación durante la incubación de los microcosmos. 22

3.2 Abundancia relativa de los gremios de AOA y BOA mediante NMP-PCR. 24

3.3 Composición del gremio de AOA en el suelo semiárido. 27

3.4 Efecto del agua y el acetileno sobre la diversidad del gremio de AOA durante la incubación de los microcosmos. 34

4.- DISCUSIÓN **40**

4.1 Efecto del agua y el acetileno sobre la actividad de nitrificación durante la incubación de los microcosmos. 40

4.2 Efecto del riego sobre la abundancia de las comunidades oxidadoras de amonio durante la incubación de los microcosmos. 43

4.3 Composición de la comunidad de arqueas oxidadoras de amonio. 45

4.4 Análisis de la diversidad de la comunidad de arqueas oxidadoras de amonio durante la incubación de los microcosmos. 46

5.- CONCLUSIONES **48**

6.- BIBLIOGRAFÍA **49**

FACULTAD DE CIENCIAS
BIBLIOTECA CENTRAL
U. DE CHILE

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de las etapas claves que conforman al ciclo del Nitrógeno.	4
Figura 2	Contenido de amonio y contenido de nitrato determinados durante el periodo de incubación de los microcosmos.	23
Figura 3	Valores promedio de pH ± desviación estándar determinados durante el periodo de incubación de los microcosmos.	24
Figura 4	Productos de la amplificación del gen *amoA* de arqueas y bacterias.	26
Figura 5	Producto de amplificación del gen A-*amoA*.	28
Figura 6	Perfiles de RFLP de clones pertenecientes a la genoteca del gen A-*amoA*.	29
Figura 7	Dendrograma del gen A-*amoA*.	31
Figura 8	Curva de rarefacción para el gen A-*amoA*.	33
Figura 9	Frecuencias relativas de los T-RFs obtenidos para el gen A-*amoA* de los clones de la genoteca.	35
Figura 10	Frecuencias acumuladas de los T-RFs (expresadas como porcentaje relativo de fluorescencia, % UF), para el gen A-*amoA* a diferentes tiempos de incubación.	37
Figura 11	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP del gen A-*amoA* y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos.	39
Figura 12	Diagrama del ciclo del nitrógeno incluyendo el proceso de amonificación.	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Partidores utilizados para amplificar por PCR utilizados en este trabajo.	17
Tabla 2	Rango de abundancias relativas de los gremios de AOA y BOA en el microcosmos.	26
Tabla 3	Frecuencia y abundancia relativa de los clones que conforman la genoteca del gen *amoA* de arqueas.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

A-*amoA*	Gen que codifica para la subunidad α de la enzima amonio mono-oxigenasa de arqueas
AOA	Arqueas Oxidadoras de Amonio
B-*amoA*	Gen que codifica para la subunidad α de la enzima amonio mono-oxigenasa de bacteria
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOA	Bacterias Oxidadoras de Amonio
dNTP	Deoxiribonucleotido trifosfato
CCA	Canonical Correspondence Analysis (análisis de correspondencia canónica)
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirobonucleico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilen-diamino-tetracético)
MVSP	Multi-Variate Statistical Package (paquete de estadísticas multivariadas)
NH_4^+	Contenido de amonio
NMP-PCR	Número Mas Probable asociado a PCR
NO_3^-	Contenido de nitrato
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment length polymorphism (polimorfismo en la longitud del fragmento terminal de restricción)
T-RF	Terminal Restriction Fragment (fragmentos terminales de restricción)
UF	Unidades de fluorescencia
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method with Aritmetic mean (método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética)

RESUMEN

La nitrificación es un proceso central en el ciclo del nitrógeno, ya que regula los contenidos de amonio y nitrato en el ecosistema. Esta etapa del ciclo es llevada a cabo por dos gremios que oxidan el amonio, uno de ellos compuesto por bacterias provenientes de los grupo β- y γ-proteobacteria (BOA); y el otro por arqueas oxidadoras de amonio (AOA), pertenecientes al phylum Crenarchaeota. Puesto que se ha demostrado que las arqueas de este phylum son ubicuas en el suelo, se supone que ellas podrían cumplir un papel relevante en el proceso de nitrificación, similar al de las BOA. En el suelo semiárido proveniente del matorral esclerófilo de Chile se ha reportado un aumento en la tasa de nitrificación debido a la adición periódica de agua. Dado estos antecedentes, se estudió la comunidad de arqueas oxidadoras de amonio en este suelo, mediante un ensayo de microcosmos sometido a tratamientos de riego periódico, de inhibición de la nitrificación por acetileno (100 Pa) y un control sin riego, con el propósito de evaluar la participación de las AOA en la oxidación del amonio. La tasa de nitrificación se determinó midiendo el contenido de nitrato y amonio y se encontró que la hidratación del suelo produce un incremento en el contenido de nitrato, el cual no se observa en presencia de acetileno, alcanzando valores similares al control sin riego. Por su parte, el contenido de amonio presentó fluctuaciones cíclicas en los 3 tratamientos, probablemente debido al aporte de amonio proveniente del proceso de amonificación; sin embargo, el tratamiento con acetileno presentó los contenidos más elevados de amonio a lo largo de la incubación. La abundancia de ambos gremios microbianos se estimó utilizando la técnica del NMP-PCR, usando como marcador molecular el gen *amoA* arqueal y bacteriano. Los datos muestran que el riego induce un aumento en ambos gremios, siendo las BOA predominantes en este tipo de suelo alcanzando valores del orden de $10^5 - 10^7$ unidades génicas por gramo de suelo (UG/g), mientras que las

arqueas alcanzaron valores del orden de 10^3 UG/g. Para determinar la composición del gremio de AOA, se construyó una genoteca para el gen *amoA*, todos los clones se asociaron a secuencias de AOA derivadas de suelo. El porcentaje de cobertura de la genoteca fue entre un 81% y 84% de cobertura para un 99% y 97% de similitud de secuencias, respectivamente. Por último, se evaluó mediante perfiles de T-RFLP la diversidad del gremio AOA de los microcosmos sometidos a los tratamientos indicados anteriormente. Los resultados no mostraron cambios en la riqueza de T-RFs, pero sí se observan cambios en la abundancia de T-RFs entre los tratamientos, siendo éstos más importantes cuando se comparan los microcosmos con riego y aquellos tratados con acetileno. En estos perfiles la mayoría de los T-RFs se pudieron asociar a los T-RFs obtenidos por análisis *in silico* de las secuencias de los clones de la genoteca. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que las AOA no son el grupo dominante en estos suelos y que el gremio BOA da cuenta de la mayor actividad de nitrificación bajo las condiciones del ensayo de microcosmos.

ABSTRACT

The nitrification is an important process because it determines the ammonia and nitrate content in the ecosystem. This process is carried out by two microbial guilds that oxidize ammonia, the ammonia oxidizing bacteria (AOB), which form two distinct monophyletic groups within the β- and γ-proteobacteria, and the ammonia oxidizing archaea (AOA) belonging to the phylum Crenarchaeote. Since it has been shown that archaea of this phylum are ubiquitous in soil, it is assumed that they could play a role in the nitrification process, similar to that of the BOA. In the semiarid soil from the sclerophyllous "matorral" of Chile it has been reported an increase in the nitrification rate due the regularly adition of water. The purpose of this work was to evaluate the participation of AOA in the ammonia oxidation by means of a microcosms assay with semiarid soil subjected to three treatments: a microcosm periodically irrigated; another with acetylene, an inhibitor of autotrophic ammonia oxidation (100 PA); and a control microcosms without treatment. The nitrification rate was evaluated by measuring the nitrate and ammonia contents, it was found that the irrigation increased the nitrate content and this is not observed in the microcosm with acetylene. On the other hand, in the three treatments the content of ammonia had a cyclic behavior, probably due to the contribution of ammonia from the process of ammonification; however, the treatment with acetylene showed the highest ammonia content throughout the incubation time. The abundance of both guilds was estimated using the MPN-PCR, using as a molecular marker the *amoA* gene for bacteria and archaea. The results show that irrigation induces an increase in both groups, predominating in this soil type AOB, which reached values in the order of 10^5-10^7 gene units per gram of soil (GU/g), compared with AOA that reached values in the order of 10^3 GU/g. To determine the AOA guild composition, it was constructed a library for the *amoA* gene, all the clones were associated with AOA

clones from different soils. The coverage percentage of the gene library was 81% and 84% with a 99% and 97% of sequences identity, respectively. Finally, the AOA guild diversity was evaluated by T-RFLP analysis under all the treatments. The results showed no changes in richness of T-RFs, but a change in the abundance between treatments was reported, being most important the difference between the microcosm with irrigation, compared to the microcosm with acetylene. Most of the T-RF profiles might be associated with T-RFs found by an *in silico* analysis of the clones library sequences. The results of this work suggest that AOA are not the dominant group in this soils and AOB explains the higher nitrification activity under the microcosm's conditions.

1.- INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es un elemento esencial para la síntesis de aminoácidos, bases nitrogenadas y aminoazúcares que forman las principales macromoléculas de importancia biológica. Sin embargo, este elemento está sólo disponible, para la mayoría de la biota, en su forma combinada como amonio, nitrato o nitrógeno orgánico. El ciclo biogeoquímico del nitrógeno comprende sucesivas reacciones de oxidación y reducción, las cuales están sometidos a una continua revisión, ya sea por la inclusión de nuevos organismos responsables de alguna de sus etapas, o bien por el descubrimiento de nuevas reacciones del ciclo (Hayatsu y col., 2008). Sin embargo hay procesos claves que estructuran al ciclo como tal (Figura 1):

1. Fijación biológica del nitrógeno: consiste en la reducción del nitrógeno molecular (N_2) en amonio (NH_4^+), en una reacción catalizada por la enzima nitrogenasa, de este modo el nitrógeno atmosférico se convierte en una molécula biológicamente disponible. Los microorganismos responsables de esta etapa son procariontes, denominados diazótrofos y se caracterizan genéticamente porque poseen el operón *nif*HDK que codifica para la nitrogenasa. La capacidad de fijación de nitrógeno está ampliamente distribuida entre microorganismos no relacionados que pertenecen a los dominios Bacteria y Arquea (Zehr et al., 2003). En el dominio Bacteria, diferentes géneros poseen esta capacidad, la cual puede ser realizada en vida libre o en simbiosis con macroorganismos, en una gran variedad de contextos metabólicos, tanto en ambientes terrestres como acuáticos (Young y col., 1992). Ejemplos de bacterias diazótrofas de vida libre anaeróbicas obligadas o facultativas son: *Clostridium pasteurianum* y *Klebsiella pneumoniae*; ejemplos de aeróbicas

obligadas: *Azobacter vinelandii*, (Roberts y Brill, 1981); y como ejemplos de diazótrofos simbiontes destacan rizobios y cianobacterias. Otros microorganismos pueden fijar tanto en vida libre como en simbiosis, como es el caso de las actinobacterias del género *Frankia*.

2. Nitrificación: es el proceso por el cual el amonio (NH_4^+) es oxidado a nitrato (NO_3^-). Este proceso se realiza en etapas, primero el NH_4^+ se oxida a nitrito (NO_2^-) mediante la conversión del NH_4^+ en hidroxilamina (NH_2OH), reacción catalizada por la enzima amonio-monooxigenasa (AMO), y luego la hidroxilamina (NH_2OH) es convertida a NO_2^- por la enzima hidroxilamina reductasa (HAO). Finalmente el NO_2^- es oxidado a NO_3^-, por la enzima nitrito oxidoreductasa (NOR). El proceso de nitrificación está asociado a 2 grupos funcionales bacterianos, las bacterias oxidadoras de amonio (BOA) y las bacterias oxidadoras de nitrito (BON), la oxidación del amonio es considerada la reacción limitante de la nitrificación y, por consiguiente, las BOA han recibido mayor atención en los últimos años (DeBoer and Kowalchuk, 2001). Las BOA constituyen un grupo funcional que comprende 2 grupos monofiléticos, uno de ellos incluye cepas de *Nitrosococcus oceanus*, de la subdivisión γ-proteobacterias y el otro comprende los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosospira* de la subdivisión β-proteobacterias (Belser, 1979; Kowalchuk y Stephen, 2001). Recientemente, se han detectado arqueas oxidadoras de amonio (AOA) en suelos (He y col., 2007; Shen y col., 2008; Jia y col., 2009) como en ambientes marinos (Venter y col., 2004; Konneke y col., 2005). Estas arqueas pertenecen al phylum Crenarchaeota, el cual se encuentra ampliamente distribuido en ambientes mesofílicos marinos y terrestres (Nicol y Schelper, 2006; Francis y

col., 2007). El gen *amoA* en arqueas fue identificado y se midió la tasa de transcripción (Hatzenpinchler y col., 2008; Tourna y col., 2008).

3. Desnitrificación: es el paso que completa el ciclo, puesto que el nitrato (NO_3^-) se reduce a nitrógeno molecular (N_2) en sucesivas reducciones donde el (NO_3^-) se convierte en (NO_2^-) mediante la enzima nitrato reductasa (codificada por los genes *nar*GHI), luego la nitrito reductasa (codificada por el gen *nir*K o *nir*S) cataliza el paso de NO_2^- a óxido nítrico (NO), este último se reduce a óxido nitroso (N_2O) por la enzima óxido nítrico reductasa (codificada por el gen *nor*BC); para finalmente concluir la reducción en nitrógeno molecular y liberarlo a la atmósfera mediante la reacción catalizada por la óxido nitroso reductasa (codificada en el gen *nos*Z) (Zumft, 1997). Esta etapa es llevada a cabo tanto por microorganismos autótrofos como heterótrofos (Hayatsu y col., 2008). La desnitrificación se ha descrito en bacterias, arqueas y hongos (Zumft, 1997; Shoun y col., 1996; Philippot, 2002)

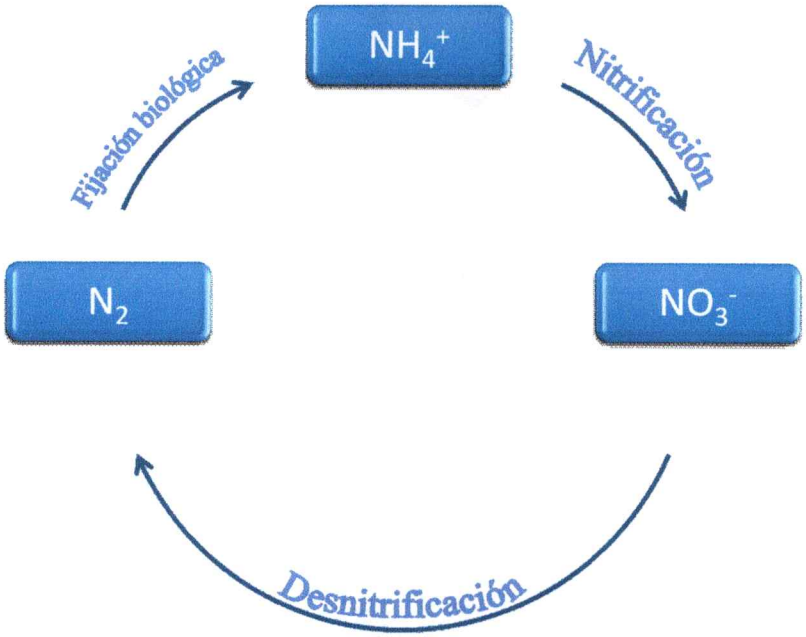

Figura 1. Diagrama de las etapas claves fijación biológica de nitrógeno, nitrificación y desnitrificación que conforman al ciclo del Nitrógeno.

La nitrificación cobra importancia por su contribución a la pérdida de nitrógeno en el suelo debido a la lixiviación de nitratos y a la subsecuente etapa de desnitrificación. En ambientes marinos la importancia del proceso se atribuye a la mineralización del nitrógeno proveniente de fuentes orgánicas, y en las aguas costeras a la eliminación del nitrógeno que tiene su origen en desechos antropogénicos (Nicol y col., 2006). Además se considera que la oxidación del amonio genera un impacto medioambiental importante, puesto que contribuye a la emisión de gases invernadero dado que durante el proceso de oxidación de la hidroxilamina a nitrito, un intermediario inestable puede descomponerse espontáneamente formando óxido nitroso (N_2O) (Hayatsu y col., 2008). Finalmente, es un

proceso clave en la eliminación de nitrógeno en el tratamiento de aguas residuales (Tourna y col., 2008; Nicol y col., 2006)

La oxidación del amonio se considera el paso limitante en la etapa de nitrificación. Hasta hace pocos años se pensaba que la oxidación autótrofa del amonio era realizada exclusivamente por bacterias provenientes de 2 grupos monofiléticos dentro de las β- y γ-proteobacterias. Sin embargo, estudios metagenómicos de muestras marinas y de suelo revelaron la presencia de secuencias putativas de los genes *amoA*, *amoB* y *amoC* de la amonio-monooxigensa de bacteria que estuvieron relacionadas con el dominio arquea (Venter y col., 2004; Treusch y col., 2005). La presencia de estos genes evidencia una posible participación de arqueones en el proceso de nitrificación.

Si bien el dominio arquea, en un comienzo, fue asociado a ambientes extremos, actualmente se ha demostrado su presencia en un amplio espectro de ecosistemas tanto extremófilos como mesófilos. Dentro de los reinos de arqueas, las crenarqueotas se han encontrado distribuidas de forma global constituyendo una biomasa considerable de los organismos procariontes de ambientes mesófilos marinos y terrestres (Nicol y Schelper, 2006). Estudios del gen que codifica para la subunidad menor del RNA ribosomal 16S (rRNA 16S) en diferentes ambientes, demuestran que el reino Crenarchaeota está ampliamente distribuido en ambientes "moderados", encontrándose en suelo agrícola, bosques, pastizales, sedimentos, agua dulce, entre otros (Brintrim y col., 1997; Jurgens y col., 1997; Buckley y col., 1998; Nicol y col., 2005; Schelper y col., 1997). Se estima que al menos el 6% de los procariontes provenientes del suelo y de ambientes marinos podrían corresponder a crenarqueotas (Nicol y col., 2006). El análisis filogenético de crenarqueotas no-extremófilas muestra una clara distinción entre las secuencias obtenidas de nichos

ecológicos diferentes; de esta manera la mayoría de las secuencias marinas se encuentran agrupadas en el clado o linaje 1.1a, mientras que las secuencias obtenidas de muestras de suelo se agrupan en el clado 1.1b (Prosser y Nicol, 2008). Actualmente el análisis filogenético de las arqueas oxidadoras de amonio (AOA) se realiza utilizando como marcador molecular el gen *amoA* y una región específica del gen del rRNA 16S puesto que existe congruencia filogenética entre ellos (Junier y col., 2010).

Las secuencias del gen *amoA* de bacterias y arqueas no presentan homología significativa, el análisis filogenético de estos genes los presenta como genes distantes; sin embargo a nivel de proteína existe aproximadamente un 25% de identidad de secuencia y aproximadamente un 40% de similitud, encontrándose residuos aminoacídicos conservados en potenciales centros coordinados para metales (Treusch y col., 2005). Sin embargo, la presencia de los genes que codifican para la enzima responsable del primer paso en el proceso de nitrificación, no son evidencias suficientes para poder aseverar que representantes de este dominio tienen la facultad de oxidar el amonio. Sólo recientemente, se aisló y cultivó *Nitrospumilus maritimus* un arqueón marino no-termófilo capaz de oxidar amonio a nitrito y crecer autotróficamente con amonio como única fuente de energía (Könneke y col., 2005), al igual que *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*, arquea termófila aislada a partir de sedimentos del parque Yellowstone (de la Torre y col., 2008).

Si bien el cultivo de representantes AOA permiten confirmar la capacidad de grupos arqueales de oxidar el amonio y así suponer acerca de su rol en el ciclado del nitrógeno, las técnicas dependientes de cultivo tienen un sesgo importante considerando que aproximadamente sólo un 1% de los microorganismos se encuentra cultivado (Amamm y col., 1995; Torsvik y col., 2002; Rappé y Giovannoni, 2003). Por otra parte el

enriquecimiento para el aislamiento y cultivo de microorganismos específicos produce una alteración de la estructura de la comunidad original (Ramsey y col., 2006; Singh y col., 2006).

Por lo tanto, las técnicas independientes de cultivo son utilizadas como una herramienta para poder estudiar ensambles microbianos *in situ*. Estos procedimientos se basan principalmente en la amplificación de marcadores genómicos específicos, tales como el gen que codifica para el rRNA 16S, o bien genes funcionales que se asocian a grupos funcionales determinados.

Mediante amplificación por PCR de fragmentos genómicos, es posible detectar la presencia de microorganismos específicos y también tener una aproximación del número de copias del gen presente en el ensamble microbiano. La técnica del Número Mas Probable asociado a PCR (NMP-PCR) basada en la amplificación de diluciones seriadas del DNA hasta su extinción, permite estimar la abundancia de unidades génicas en la muestra (Sharma y col., 2007). Este método semi-cuantitativo se ha utilizado tanto en la detección de toxinas (Mäitenen y col., 1997) y agentes patógenos (Luan y col., 2008), como en la comparación de bacterias nitrificadoras en suelos sometidos a diferentes tratamientos (Degrange y col., 1998). Por otro lado, la técnica del polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal (T-RFLP) permite diferenciar amplicones de similar tamaño pero que difieren en su secuencia (Liu y col., 1997). Mediante perfiles de T-RFLP de un ensamble microbiano es posible estimar la riqueza de filotipos presentes en la muestras a partir de la distribución de los fragmentos terminales de restricción (T-RFs), y determinar la abundancia de éstos según la fluorescencia relativa de cada T-RF (Yeager y col., 2005).

La identificación del gen *amoA* de arqueas, el aislamiento y el cultivo de representantes AOA (Könneke y col., 2005; de la Torre y col., 2008; Hatzenpinchler y col., 2008) como la comparación entre los gremios de BOA y AOA en diferentes ecosistemas (He y col., 2007; She y col., 2008; Tourna M. y col., 2008; Offre y col., 2009; Jia y Conrad, 2009); ha llevado a un creciente interés por determinar el papel de las AOA en la nitrificación.

Erguder y col. (2009) recopilaron amplia información sobre los estudios de las comunidades BOA y AOA en diferentes tipos de muestras, y con ello lograron atisbar algunos factores y ciertas condiciones que podrían favorecer a uno u otro grupo funcional, proponiendo la existencia de nichos ecológicos en donde domina una comunidad por sobre la otra. Los factores que se muestran como determinantes son el pH, la concentración de amonio, el oxígeno disuelto y la concentración de fosfatos.

Sin embargo, hasta ahora ha sido difícil determinar el aporte de la oxidación del amonio, mediado por arqueas versus el realizado por bacterias, al proceso de nitrificación global porque no existen inhibidores selectivos para estos grupos microbianos. Es así como las aproximaciones utilizadas han sido determinar el cambio en las abundancias relativas y correlacionarlas con la actividad de nitrificación. Para ello se ha utilizado el acetileno como inhibidor de la oxidación autótrofa del amonio (Hyman y Knowles, 1985). El acetileno es un inhibidor suicida de la enzima hidroxilaminoreductasa, concentraciones de acetileno tales como 10 Pa son suficientes para inhibir por completo la oxidación autótrofa de amonio en suelo agrícola (Berg y col., 1981). Aun así, estudios realizados en suelos a diferentes presiones parciales de acetileno entregan resultados dispares en cuanto a la

estructura y abundancia de las comunidades BOA y AOA (Offre y col., 2009; Jia y Conrad, 2009).

En el presente trabajo, se estudiará la diversidad de AOA en microcosmos de suelo del matorral esclerófilo de Chile. Estos ecosistemas semiáridos sufren ciclos de sequía y precipitación ("drying-rewetting") que se caracterizan por una precipitación fuertemente estacional (Austin y col., 2004). En estos ecosistemas la disponibilidad de agua afecta, entre otras cosas, al 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). En este tipo de suelo también se considera como un factor limitante el nitrógeno disponible (Hooper y Johnson, 1999; Ehleringer, 2001). Se ha propuesto que en suelos de baja concentración de carbono, un factor decisivo en la disminución de la diversidad es el aumento del contenido hídrico, en donde el agua actuaría como un puente entre diferentes partículas de suelo, impidiendo que se agoten los recursos y determinando que aquellos microorganismos capaces de utilizar estos recursos con mayor eficacia, predominen por sobre los otros (Zhou y col., 2002). Asimismo, se ha observado que un aumento del contenido hídrico en suelos semiáridos del matorral esclerófilo de Chile central favorece principalmente el proceso de nitrificación (Bustamante, 2010). Pero se desconoce si hay un aporte de las AOA a este proceso.

En base a los antecedentes presentados se planteó la siguiente hipótesis: "Si las arqueas oxidadoras de amonio mesófilas son microorganismos abundantes en suelos y ellas participan en la nitrificación, entonces en suelos semiáridos, cuando se producen cambios

en la nitrificación, se espera que cambie la diversidad (riqueza y abundancia) del gremio de arqueas oxidadoras de amonio".

Objetivo General:

Estudiar la diversidad genética del gremio de las arqueas oxidadoras de amonio (AOA) en suelos semiáridos del matorral esclerófilo de Chile Central (El Romeral).

Objetivos Específicos:

1.- Determinar la composición del gen *amoA* de arqueas oxidadoras de amonio en el suelo semiárido del matorral esclerófilo de Chile central.

2- Evaluar la tasa de nitrificación según los cambios en las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- durante la incubación de microcosmos de suelo semiárido.

3.- Evaluar la abundancia relativa de AOA y BOA en los microcosmos de suelo semiárido.

4.-. Determinar la diversidad de filotipos de las arqueas oxidadoras de amonio durante la incubación de microcosmos de suelo semiárido.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección de muestras

Las muestras de suelo utilizadas para el montaje de los microcosmos se recolectaron de la localidad "El Romeral" (33°48'S, 70°14'W), ubicada en el Cajón del Maipo, Región Metropolitana, Chile. Este sector presenta un suelo de tipo semiárido del matorral esclerófilo de Chile y un clima mediterráneo seco con precipitaciones invernales que promedian los 350 mm anuales (Gajardo, 1994).

Las muestras se obtuvieron del horizonte superficial del suelo. Se tomaron 10 muestras simples a 10 cm de profundidad en un área de 10 x 10 m, éstas se homogeneizaron para obtener una muestra compuesta y así reducir la heterogeneidad espacial a pequeña escala según lo descrito por Webster y col. (2002) y Girvan y col. (2003). Las muestras se transportaron y almacenaron a 4°C hasta su utilización.

2.2 Diseño y montaje de los microcosmos

Los microcosmos se construyeron con 100 g de suelo, derivados de la muestra compuesta, los cuales se colocaron en recipientes de vidrio con una capacidad de 515 ml y se mantuvieron a 20°C durante 84 días. Los microcosmos se trataron en triplicado de la siguiente manera:

1. Control sin aplicación de riego ni de acetileno (s/R – s/A).

2. Riego con agua desionizada cada 14 días, sin la aplicación de acetileno. Bajo estas condiciones está descrito que ocurre nitrificación en estos suelos comparado con el control sin riego (Bustamante, 2010) (c/R – s/A).

3. Riego con agua desionizada cada 14 días, manteniendo una atmósfera con 100 Pa de acetileno. El acetileno está descrito como un inhibidor de la enzima amonio-monooxigenasa (Hyman y Wood, 1985) y por lo tanto se espera inhibir la nitrificación de estos suelos (c/R – c/A).

El riego se aplicó hasta alcanzar el 60% de la capacidad de retención de agua del suelo. Para mantener condiciones aeróbicas todos los microcosmos se airearon cada 3 días y se reconstruyó la atmósfera con acetileno a 100 Pa.

Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos se tomaron submuestras de cada uno de los microcosmos semanalmente. Para determinar los perfiles de diversidad genética las muestras se tomaron cada 28 días.

2.3 Determinación de los parámetros fisicoquímicos

2.3.1 Contenido de nitrato y amonio

La extracción del nitrato y amonio se realizó según el protocolo descrito por Forster (1995). Un gramo de suelo proveniente de cada réplica de microcosmos se agitó a 150 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente con 10 ml de KCl 2 M y 10 ml de agua desionizada para la extracción de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+), respectivamente. Las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- se determinaron mediante métodos colorimétricos (Nelson, 1983; Yang y col., 1998). Las mediciones se realizaron por duplicado.

Para determinar el NH_4^+ se utilizaron 100 µl del extracto en KCl 2M, éste se mezcló 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 incubó por 15 min a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 5 ml de una solución alcalina de hipoclorito de sodio (NaClO 0,05 % y NaOH 0,75 M) y después de 1 h se midió la absorbancia de las muestras a 660 nm.

Para determinar el NO_3^-, se mezcló 1 ml del extracto en agua desionizada con 500 µl de solución TRI (salicilato de sodio 1 %, NaCl 0,2 % y sulfamato de amonio 0,1 % en solución de NaOH 0,01 M), se dejó evaporar totalmente en estufa a 100°C durante 2 h y luego se dejó enfriar. El residuo se resuspendió en 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Luego de 15 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 muestra en un espectrofotómetro a 410 nm.

2.3.2 Medición de pH

El pH se determinó potenciométricamente a partir de los extractos en KCl y agua desionizada (Steubing y col., 2002).

2.4 Diversidad Genética del gremio de oxidadores de amonio

2.4.1 Extracción de DNA

El DNA de las muestras de suelo se extrajo a partir de 0,3 g de suelo, utilizando el kit "Ultra Clean Soil DNA" (MoBio Lab, Inc) según las indicaciones del fabricante. La extracción se realizó cada 28 días. El DNA obtenido se resuspendió en 30 µl de buffer TE y se almacenó a -20°C.

2.4.2 Amplificación por PCR

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl que contenía GoTaq® Green Master Mix (GoTaq® DNA Polimerasa en 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5), 200 µM de cada dNTP y 1,5 mM $MgCl_2$) (Promega) y los partidores requeridos para cada reacción (Tabla 1).

Los productos de amplificación del DNA se separaron por electroforesis a 100 V durante 45 minutos en geles de agarosa al 1,2 % en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM), teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y visualizados mediante luz ultravioleta. Para determinar el tamaño del fragmento se usó el marcador de peso molecular 100 pb.

2.4.2.1 Amplificación del gen amoA de arqueas

Para estudiar la composición, la diversidad genética y la abundancia relativa de arqueas oxidadoras de amonio (AOA) se utilizó como marcador molecular el gen que codifica para la subunidad α de la enzima amonio mono-oxigenasa de arqueas (gen A-*amoA*). Para la amplificación del gen A-*amoA* se usaron los partidores Crenamo23f y

Crenamo616r (Tabla 1). La mezcla de reacción contenía ambos partidores a una concentración de 200 nM. El programa de amplificación fue el siguiente: una primera etapa de denaturación a 95°C por 5 min, seguida de 10 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 1 min a 72°C; luego 25 ciclos de 30 s a 92°C, 30 s a 55°C y 1 min a 72°C. Finalizando con una extensión final a 72°C por 10 min.

2.4.2.2 Amplificación del gen amoA de bacterias

Para estimar la abundancia relativa de las bacterias oxidadoras de amonio (BOA) se utilizó como marcador molecular al gen que codifica para la subunidad α de la enzima amonio mono-oxigenasa de bacterias (gen B-*amoA*). Para la amplificación del gen B-*amoA* se utilizó 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. Para la segunda reacción de PCR se utilizó como molde 1 µl del producto de la primera reacción de PCR, y los partidores *amoA*-1F y *amoA*-2R a una concentración de 660 nM (Tabla 1). El programa de amplificación constó de una primera etapa 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. Para la segunda amplificación los parámetros fueron los siguientes: 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.

Tabla 1. Partidores utilizados para amplificar por PCR utilizados en este trabajo.

Gen	Partidor	Secuencia (5'-3')[a]	Tamaño (pb)	Referencia
A-*amoA*	CrenamoA23f	ATGGTCTGGCTWAGACG	624	Tourna y col., 2008
	CrenamoA616r	GCCATCCATCTGTATGTCCA		
B-*amoA*	*amoA*-2F	AARGCGGCSAAGATGCCGCC	800	Webster y col., 2002
	amoA-5R	TTATTTGATCCCCTC		
B-*amoA*	*amoA*-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	490	Rotthauwe y col., 1997
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
Vector	M13f	GTAAAACGACGGCCAG		
	M13r	CAGGAAACAGCTATGACC		

[a]W (A/T); K (G/T); S (C/G); R (A/G).

2.4.3 NMP-PCR

Para estimar la abundancia relativa de AOA y BOA se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP) asociado a la reacción de PCR, usando como señal el producto de PCR de la amplificación del gen B-*amoA* y A-*amoA*. Para ello se realizaron diluciones seriadas del DNA extraído del suelo de los microcosmos a los tiempos t0 y t56 de la incubación, cada dilución se utilizó como molde para la reacción de PCR que se realizó por triplicado. Los partidores utilizados para la amplificación del gen *amoA* (Tabla 1) y los programas para llevar a cabo la reacción fueron los descritos anteriormente. Las reacciones positivas y negativas se tabularon para estimar el valor del NMP. Las Unidades Génicas (UG) de AOA y BOA se determinaron de acuerdo a los valores estandarizados del número más probable (Cocharan, 1950) corrigiendo por el factor de dilución y calculando la abundancia de UG por gramo de suelo.

2.4.4 Clonación y secuenciación

Para determinar la composición de AOA en el suelo semiárido utilizado en los ensayos de microcosmos se construyó una genoteca del gen A-*amoA*. Para ello se purificaron los productos de PCR del gen A-*amoA* con el kit Ultraclean PCR Clean-up DNA purification (MoBio Lab, Inc) y se cuantificaron usando el programa UN-SCAN-IT gel™ versión 4.1 (Silk Scientific Inc.). Los amplicones purificados se ligaron al vector pTZ57R/T. La mezcla de ligamiento se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* XL1B. El proceso de ligado y transformación se realizaron con el kit InsTAcloneTM PCR Cloning (Fermentas) según las indicaciones del fabricante. Los transformantes se seleccionaron en medio LB–ampicilina (1,0 % Triptona; 0,5 % extracto de levadura; 1,0 % NaCl; pH 7,0 con ampicilina a 50 µg/ml). Los transformantes que portaban el vector recombinante se seleccionaron por su resistencia a ampicilina y por su incapacidad de hidrolizar X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranósido) en presencia de IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido). Los clones seleccionados se resuspendieron en buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM; pH 8,0). El DNA de estas células se obtuvo mediante lisis térmica realizando 8 ciclos sucesivos de 1 min a 98°C y 1 min a 4°C. Para comprobar la presencia del inserto se utilizó 1 µl de la suspensión y se sometió a la reacción de PCR con los partidores M13f y M13r que hibridan con el vector (Tabla 1), a una concentración de 120 nM. El programa utilizado fue el siguiente: denaturación inicial de 94°C por 3 min, luego 30 ciclos con una temperatura de denaturación de 94°C por 30 s, hibridación a 56°C por 45 s y un periodo de extensión de 72°C por 1 min 30 s, para finalizar el programa con una extensión de 10 min a 72°C.

La diversidad de los amplicones se evaluó mediante perfiles de RFLP. Para ello éstos se digirieron con 30U de la enzima de corte frecuente *HhaI* (Fermentas) por 5 h a 37°C seguido de 10 min a 65°C para inactivar la enzima. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de poliacriamida al 0,8% en buffer TAE 1X y se reveló con nitrato de plata según el protocolo descrito por Neilan y col. (1994). Brevemente, los geles se fijaron en etanol al 10% durante 5 min, se sumergieron en HNO_3 al 1% durante 5 min, se lavaron tres veces con agua desionizada y se colocaron en una solución de $AgNO_3$ 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 Na_2CO_3 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%.

Los fragmentos de restricción se compararon con el marcador de peso molecular 50 bp (Gibco BRL®). Los perfiles de RFLP que presentaron un patrón de restricción diferente se secuenciaron por Macrogen Inc. (Seúl, Corea) con el analizador genético 3730XL (Applied Biosystems). Los clones correspondientes se guardaron en glicerol al 20 % a -20°C (Sambrook y col., 1989).

2.4.5 Análisis filogenético de secuencias

Las secuencias de los clones obtenidos se compararon con aquellas disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el programa BLAST-n (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MEGA 4.1 (Tamura y col., 2007). El demdrograma se construyó utilizando el índice de distancia Jukes and Cantor (Jukes y Cantor, 1969) mediante el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987).

Para construir la curva de rarefacción se utilizó el programa Clusterer (Klepac-Ceraj y col. 2006) con el cual se estimó el número de grupos que formaban las secuencias con un 99% de similitud. Luego para realizar el ajuste de la curva se utilizó el programa Analytic Rarefaction 1.3 (Holland, 2003), y para obtener la línea de tendencia y los parámetros estadísticos se empleo el programa GraphPad versión 4 (GraphPad Software Inc.). Finalmente para determinar el porcentaje de cobertura de la genoteca, se utilizó la ecuación $C_x=1-(N_x/n)$; donde C_x es el porcentaje de cobertura del muestreo realizado, N_x es el número de secuencias únicas encontradas en la genoteca, y n representa el número de secuencias analizadas.

2.4.6 Perfiles de T-RFLP

Para la obtención de los perfiles de T-RFLP, la reacción de PCR se realizó con los partidores descritos en la Tabla 1, usando el partidor CrenamoA23f marcado con el fluoróforo FAM (5-carboxifluoresceína) (Operon Inc. Technologies) en el extremo 5'. Las condiciones de amplificación usadas son aquellas indicadas previamente en el punto 2.4.3.

Los productos de PCR marcados con fluorescencia se purificaron mediante el Wizard® DNA Clean-Up System (Promega), los productos purificados se digirieron con 30 U de la enzima de restricción *Hha*I y 16 U de la enzima *Mnl*I (Fermentas) en reacciones separadas durante 12 h a 37°C, posteriormente las enzimas se inactivaron a 65°C por 10 min. Los fragmentos terminales producidos por la digestión se separaron por electroforesis capilar en un Analizador Genético ABI 3730XL (Applied Biosystem) por el servicio de tipificación de Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

2.4.7 Estandarización y análisis de los perfiles de T-RFLP

Para el análisis de los perfiles de T-RFLP sólo se incluyeron aquellos T-RFs con fluorescencias mayores a 50 unidades (para eliminar las señales basales) y con un tamaño entre 150 pb (debido a que en el perfil de T-RFLP de un control negativo se observaron señales menores a 150 pb) y 635 pb (ya que es el tamaño de las secuencias de los clones). Los perfiles se alinearon manualmente para evitar la identificación errónea de un T-RF, se calculó un promedio de las fluorescencias obtenidas en cada triplicado y el porcentaje relativo de cada T-RF con respecto a la fluorescencia total detectada en cada muestra. Con el fin de eliminar señales que podrían ser ruido dentro de las muestras, se eliminaron señales con abundancias relativas menores al 1% de la abundancia total dentro de cada muestra. Los T-RFs obtenidos para cada enzima se analizaron por separado. Adicionalmente, mediante el programa BioEdit Sequence Alingment Editor versión 7.0.5.2 (Hall, 1999), se realizó digestión *in silico* de las secuencias de los clones de la genoteca, con el fin de comparar estos resultados con los perfiles de T-RFLP obtenidos en los microcosmos.

Finalmente, para relacionar los T-RFs obtenidos con los parámetros edáficos medidos, se utilizó como método multivariado de análisis directo, el análisis de correspondencia canónica (CCA). El CCA se realizó en el programa MVSP versión 3.12 (GeoMem), considerando la abundancia relativa de cada TRF y los parámetros edáficos correspondientes a cada tratamiento.

3.-RESULTADOS

3.1 Efecto del agua y el acetileno sobre la actividad de nitrificación durante la incubación de los microcosmos.

Para evaluar la actividad potencial de nitrificación se determinó semanalmente el contenido de NH_4^+ y NO_3^- en el suelo de todos los microcosmos. En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos para el contenido de amonio (Figura 2A) y de nitrato (Figura 2B).

En la Figura 2A se puede observar que al inicio de la incubación no hay diferencias significativas en el contenido de amonio entre los tratamientos, alcanzando los mayores valores alrededor del día 28 de incubación. Sin embargo, luego de 35 días de incubación el tratamiento con acetileno (c/R - c/A) muestra un mayor contenido de amonio y éste se mantiene relativamente constante hasta el día 64, lo que sugiere que el amonio no está siendo transformado en este microcosmos, comparado con los tratamiento sin acetileno (c/R - s/A) donde la concentración de amonio es menor. Concomitante con esto, la Figura 2B muestra un aumento del nitrato en el microcosmos sin acetileno (c/R - s/A), a partir del día 7 de incubación comparado con los otros dos microcosmos. Esta tendencia es bastante clara hasta el día 64. Los resultados sugieren que durante los primeros 63 días de incubación ocurre nitrificación en el microcosmos con riego y sin acetileno (c/R - s/A) y que esta etapa del ciclo del nitrógeno está inhibida en el microcosmos con riego y con acetileno (c/R - c/A).

Hacia el final de la incubación de los microcosmos (tiempos 70, 77 y 84 días) las diferencias en las concentraciones de nitrato de los microcosmos con y sin acetileno se

reducen indicando que la nitrificación no continúa inhibida u otros procesos del ciclo del nitrógeno podrían incrementar la concentración de nitrato en el microcosmos con acetileno. Por su parte, la concentración de amonio disminuye ligeramente en el microcosmos con acetileno. De acuerdo a los resultados obtenidos para la actividad de nitrificación, los cambios en la abundancia de las arqueas oxidadoras de amonio (AOA) se evaluó al inicio (0 días) y en el tiempo 56 días de la incubación de los microcosmos, ya que durante este período se observa más claramente dicha actividad.

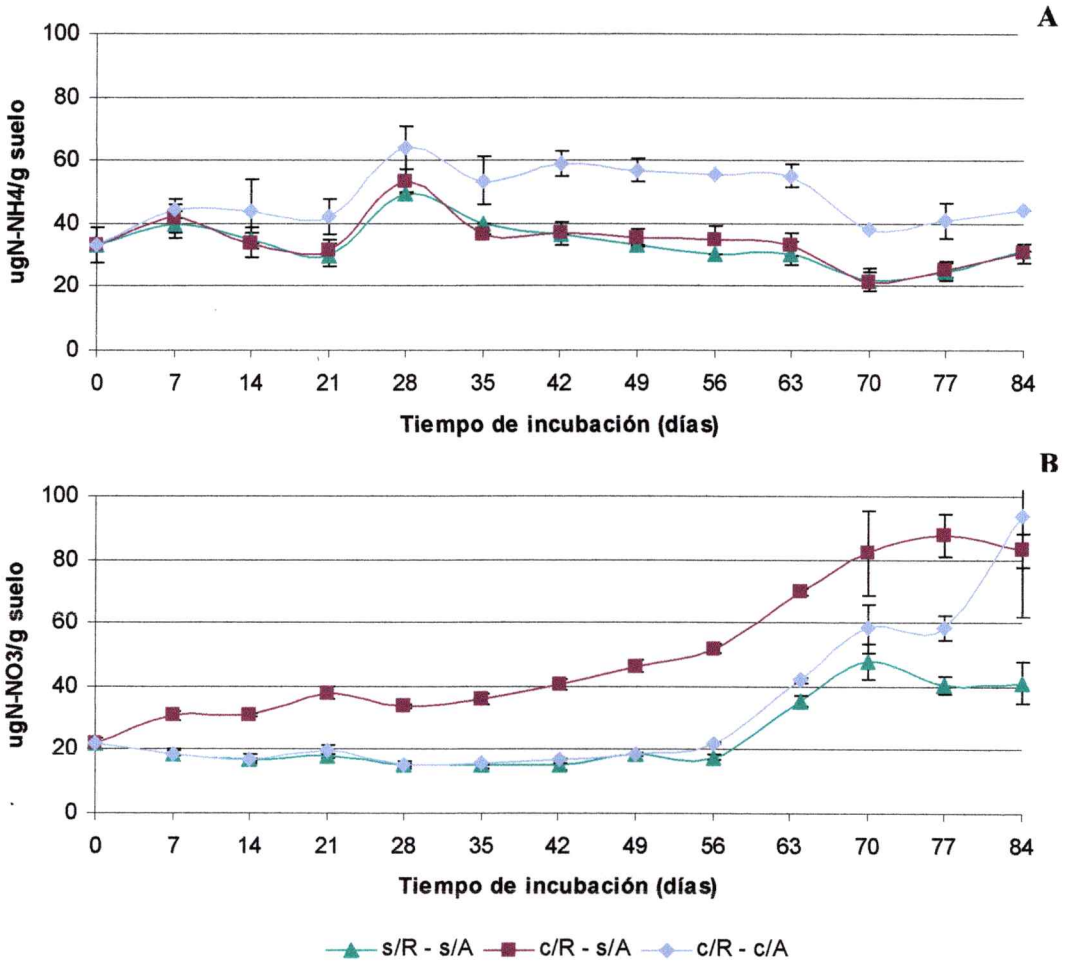

Figura 2. Contenido de amonio (ugN-NH_4^+/g_{PS}) en A, y contenido de nitrato (ugN-NO_3^- /g_{PS}) en B, determinados durante el periodo de incubación de los microcosmos sometidos a diferentes tratamientos: microcosmos control sin tratamiento (s/R - s/A), microcosmos sometidos a riego cada 14 días (c/R - s/A) y microcosmos sometidos a riego cada 14 días y tratados con acetileno (c/R - c/A). Se muestran los valores promedio ± desviación estándar.

Los valores de pH registrados a lo largo de la incubación muestran que este parámetro se mantiene en el rango de la neutralidad en los tres tratamientos aplicados, aunque se observa un ligero aumento hacia el final de la incubación de los microcosmos (Figura 3).

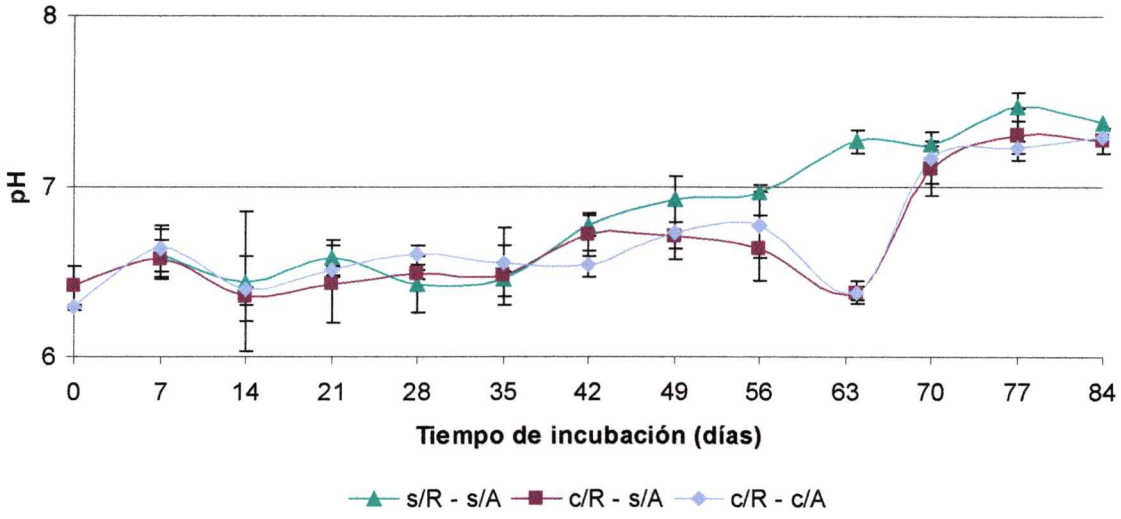

Figura 3. Valores promedio de pH ± desviación estándar determinados durante el periodo de incubación de los microcosmos sometidos a diferentes tratamientos: microcosmos control sin tratamiento (s/R - s/A), microcosmos sometidos a riego cada 14 días (c/R - s/A) y microcosmos sometidos a riego cada 14 días y tratados con acetileno (c/R - c/A). Para medir el pH se realizó una extracción desde el suelo de los microcosmos con KCl 1M.

3.2 Abundancia relativa de los gremios de AOA y BOA mediante NMP-PCR.

Se evaluó la abundancia relativa de los gremios de AOA y BOA al inicio de la incubación (0 días) y al tiempo 56 días de incubación del microcosmos, rango de tiempo de incubación donde se observó nitrificación en el microcosmo con riego y sin acetileno (c/R - s/A), mediante el procedimiento del NMP acoplado a PCR. Para esto se utilizaron

diluciones seriadas del DNA total extraído del suelo del microcosmos, el cual fue usado como molde para amplificar por PCR el gen *amoA* de arqueas (A-*amoA*) y bacterias (B-*amoA*). Cada reacción fue realizada por triplicado.

Para la amplificación del gen B-*amoA* se realizó un PCR anidado donde la segunda reacción se realiza para poder observar con mayor claridad el producto de PCR obtenido en la primera reacción y determinar así la dilución donde se extingue la señal de amplificación. Así también se procedió con la amplificación del gen A-*amoA* el cual fue sometido a una segunda reacción utilizando el mismo programa y los mismos partidores que en la primera reacción.

En la Figura 4 se muestran ejemplos de los amplicones obtenidos en la reacción de PCR para el gen *amoA* de ambos gremios. Como se puede observar las bandas son de los tamaños esperados tanto para el gen A-*amoA* (624 pb) como para el gen B-*amoA* (490 pb). Con las bandas obtenidas en la electroforesis, se tabularon el número de reacciones positivas y negativas para cada dilución hasta la extinción de la señal. El NMP de Unidades Génicas (UG) de cada gremio se determinó de acuerdo a la tabla de valores del NMP (Cocharan, 1950). Los resultados se resumen en la Tabla 2.

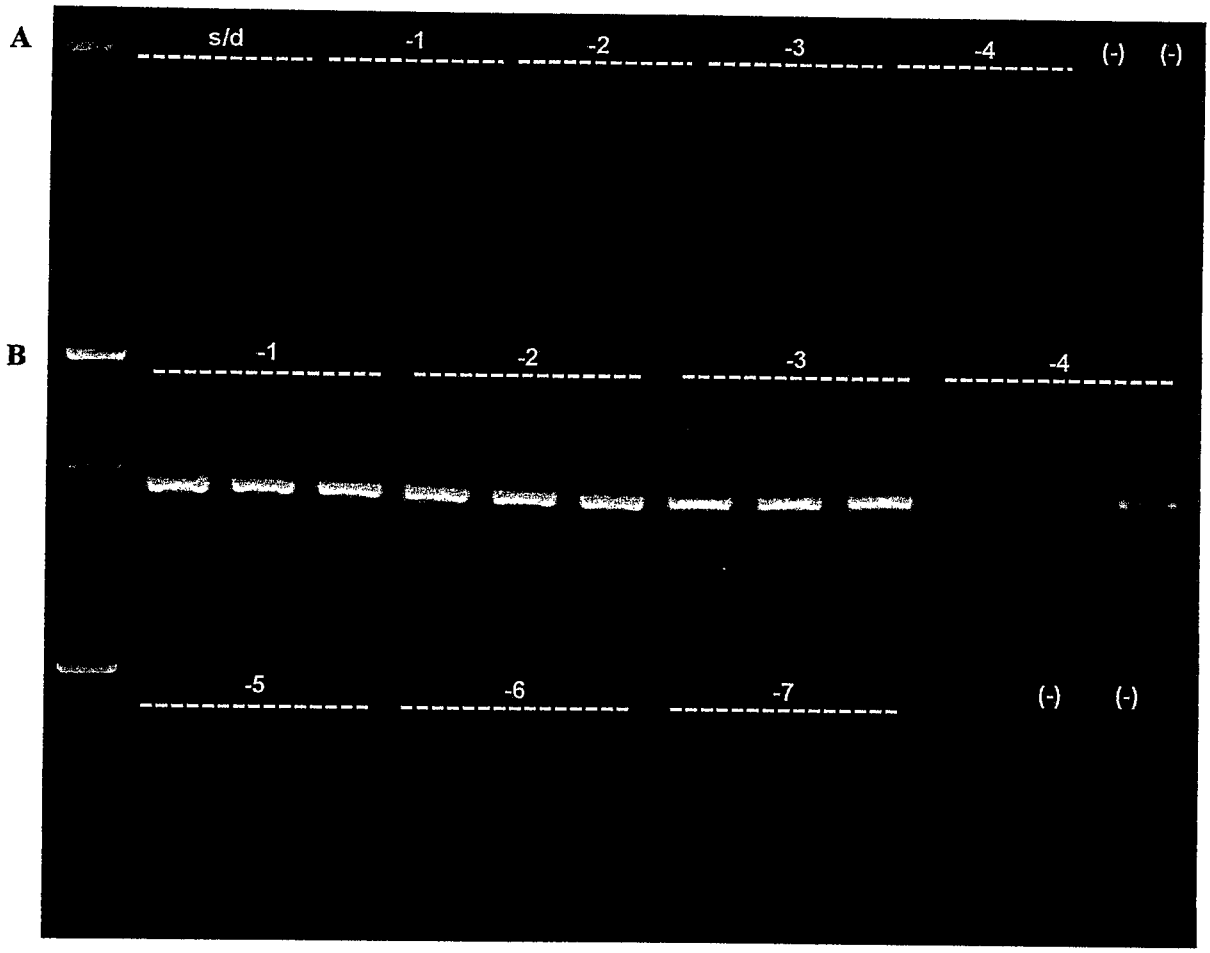

Figura 4. Productos de la amplificación del gen *amoA* de arqueas (A) y bacterias (B), visualizados en geles de agarosa al 1,2%. En el primer carril de cada gel se observa el marcador de peso molecular 100 bp; -1, -2, -3, -4, -5, -6 y -7 corresponden a las diluciones seriadas del DNA molde para la reacción; s/d corresponde a la reacción de PCR en donde se utilizó como molde el DNA sin diluir; (-) corresponde a los controles negativos de cada reacción.

Tabla 2. Rango de abundancias relativas de los gremios de AOA y BOA en el microcosmos c/R – s/A, determinadas mediante NMP-PCR y expresadas como Unidades Génicas (UG) presentes por cada gramo de suelo (UG/g suelo). t0: 0 días de incubación del microcosmos y t56: 56 días de incubación del microcosmos.

Gremio	t0 (UG/g suelo)	t56 (UG/g suelo)
AOA	$2\text{-}3 \times 10^3$	$2\text{-}9 \times 10^3$
BOA	$1\text{-}4 \times 10^5$	$0{,}1\text{-}2 \times 10^8$

Al comparar la abundancia relativa de los gremios de AOA y BOA según el tiempo de incubación, se observa que ambos aumentaron luego del período de incubación sometidos a riego. Sin embargo, la comunidad de BOA aumenta en 3 órdenes de magnitud mientras que la comunidad de AOA se mantiene en el mismo orden de magnitud.

Desde el inicio de la incubación hasta los 56 días de incubación, el gremio de BOA se muestra mayoritario, llegando a ser 5 órdenes de magnitud mayor que las AOA. Los datos muestran que el aumento en la nitrificación, observada en el microcosmos regado y sin acetileno (c/R – s/A), está asociado a un aumento en la abundancia de los gremios oxidadores de amonio, siendo predominantes las BOA en relación a las AOA.

3.3 Composición del gremio de AOA en el suelo semiárido.

Para determinar la composición de arqueas oxidadoras de amonio en el suelo semiárido, se construyó una genoteca del gen *amoA* de arqueas (A-*amoA*).

El DNA extraído desde el suelo semiárido proveniente del matorral esclerófilo de Chile central se usó como molde para la amplificación por PCR del gen A-*amoA*, los partidores empleados fueron CrenamoA23f y CrenamoA616r (Tourna y col, 2008). El fragmento esperado del producto de la amplificación es de 624 pb (Figura 5).

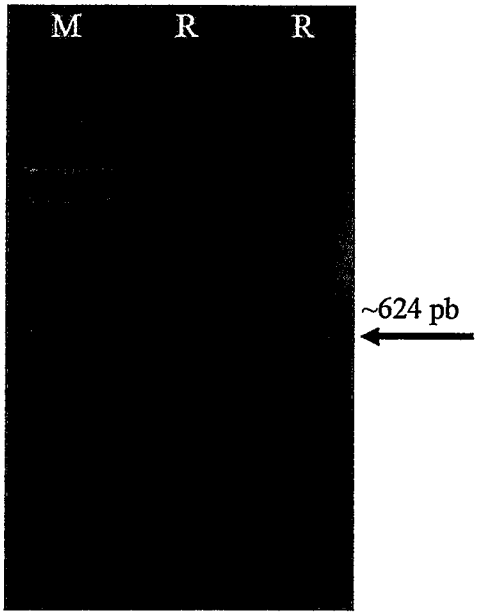

Figura 5. Producto de amplificación del gen A-*amoA*, visualizado en un gel de agarosa al 1,2%. M: marcador de peso molecular 100 bp. R: muestras donde se utilizó como molde DNA extraído del suelo semiárido.

Luego de confirmar la obtención del producto de PCR esperado, éste fue purificado, ligado al vector pTZ57R/T y clonado en *E. coli* XL1B. Las colonias seleccionadas por su incapacidad de hidrolizar X-gal en presencia de IPTG, se lisaron y se confirmó la presencia del inserto mediante PCR, usando los partidores específicos del vector de clonación, M13F y M13R, seguido de una electroforesis en gel de agarosa. El tamaño esperado para estos fragmentos fue de ~800 pb ya que incluye el amplicón del gen *amoA* más los extremos del vector del clonación. Mediante este procedimiento se obtuvieron 87 clones positivos.

Para estimar la variabilidad entre los clones se determinaron los perfiles de restricción (RFLP) de los amplicones clonados como se muestra en la Figura 6. El análisis de los perfiles de RFLP o haplotipos, usando la enzima de restricción *HhaI*, reveló 17 perfiles de restricción distintos, de los cuales los haplotipos A y B concentran más del 50%

de todos los clones (Tabla 3). Clones pertenecientes a cada perfil de restricción fueron seleccionados para ser secuenciados.

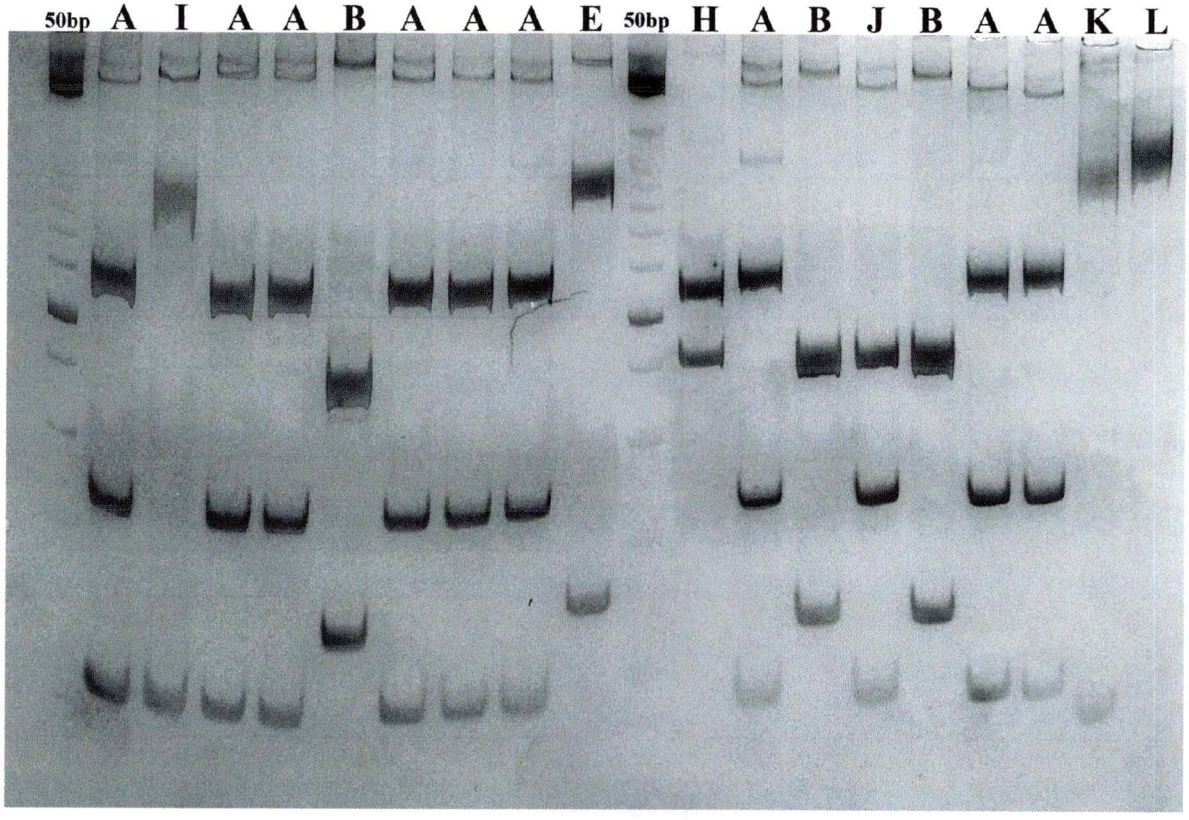

Figura 6. Perfiles de RFLP de clones pertenecientes a la genoteca del gen A-*amoA*, determinados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 0,8%. Marcador de peso molecular: 50 bp; las letras corresponden a los diferentes haplotipos de RFLP (ver Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia relativa de los haplotipos de RFLP de los clones que conforman la genoteca del gen A-*amoA*. Se incluyen los resultados de la digestión *in silico* con las enzimas de restricción *HhaI* y *MnlI*, mostrándose sólo los fragmentos del extremo 5'. La identificación de los clones corresponde a aquellos que se muestran en el dendrograma (Figura 7).

Haplotipo de RFLP	N° de clones	Frecuencia relativa (%)	T-RFs *HhaI*	T-RFs *MnlI*	Identificación de los clones
A	39	44,83	167	493	R-AOA4; R-AOA8; R-AOA42; R-AOA81
B	22	25,29	257-563	519	R-AOA9; R-AOA18
C	2	2,30	167	431	R-AOA30
D	1	1,15	167	431	R-AOA5
E	8	9,20	557	456	R-AOA38; R-AOA55
F	1	1,15	544-563	465	R-AOA23
G	2	2,30	257	493	R-AOA28
H	1	1,15	167	322	R-AOA56
I	1	1,15	563	493	R-AOA48
J	1	1,15	167	493	R-AOA59
K	1	1,15	596	519	R-AOA63
L	1	1,15	NC*	493	R-AOA64
M	1	1,15	596	480	R-AOA32
N	1	1,15	257	341	R-AOA33
O	1	1,15	563	493	R-AOA36
P	1	1,15	257	519	R-AOA91
Q	3	3,45	167	431-493	R-AOA57; R-AOA61
Total	87	100			

* NC indica que no hay cortes con la enzima de restricción por lo tanto el T-RF corresponde al largo total del amplicón.

Las secuencias de los clones se compararon con secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la herramienta bioinformática BLAST. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MEGA 4.1 y se construyó un dendrograma utilizando el índice de distancia de Jukes and Cantor y el algoritmo de agrupamiento de Neighbor-Joining (Figura 7).

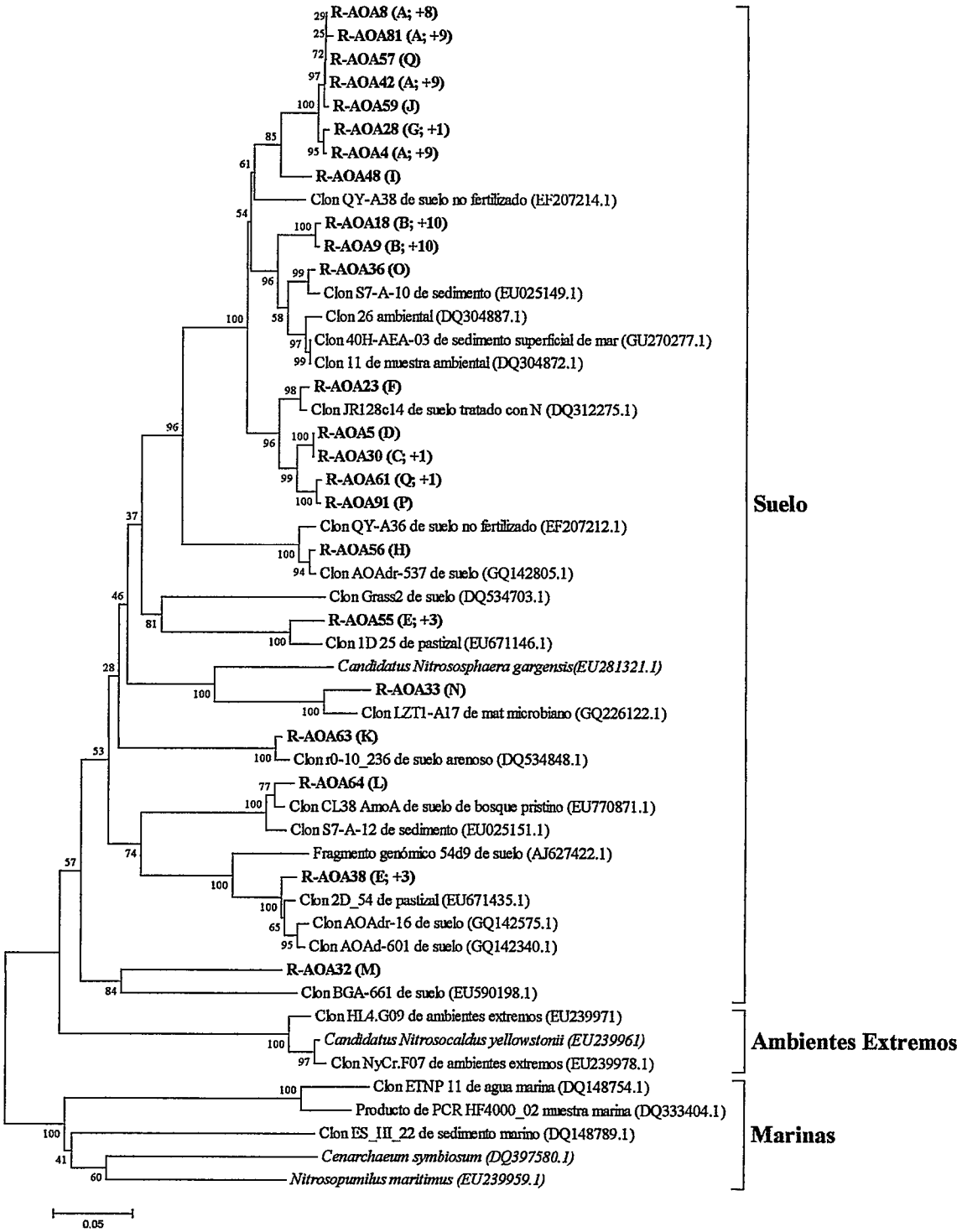

Figura 7. Dendrograma del gen A-*amoA* construido utilizando el índice de distancia Jukes and Cantor y el método de agrupamiento Neighbor-Joining. Sobre las ramas se muestra el valor de bootstrap obtenido utilizando 500 réplicas. En negrita se muestran los clones obtenidos y entre paréntesis se especifica el haplotipo correspondiente y la cantidad de clones que presentan el mismo haplotipo. Los números de acceso de las secuencias de referencia se muestran junto al nombre de cada una entre paréntesis.

En el dendrograma se incluyeron secuencias del gen *amoA* de arqueas cultivadas o enriquecidas tales como *Cenarchaeum symbiosum*, *Nitrosopumilus maritimus*, *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* y *Candidatus Nitrososphaera gargensis*.

Los resultados muestran que los clones provenientes del matorral esclerófilo están más relacionados con *Candidatus N. gargensis*, *Candidatus N. yellowstonii* y clones provenientes de ambientes extremos que con aislados y secuencias de AOA proveniente de ambientes marinos.

Todos los clones encontrados se agrupan con secuencias derivadas de muestras de suelo. Además, el haplotipo A, que fue el más abundante entre los clones, se encuentra agrupado con los haplotipos Q, J, y G. Por su parte, el haplotipo B que corresponde al segundo más frecuente, se agrupa con el haplotipo O.

Para evaluar la representatividad de la genoteca de AOA del suelo semiárido del matorral esclerófilo, se construyeron curvas de rarefacción con un 99% y 97% de similitud entre los clones estudiados (Figura 8). Los datos obtenidos fueron ajustados a una hipérbola, obteniéndose un R^2 de 0,9892 y 0,9795, respectivamente. En la Figura 8 se puede observar que con la cantidad de clones obtenidos no se alcanza una asíntota en ninguno de los 2 ajustes, indicando que la genoteca no representa la totalidad de los filotipos o grupos de AOA del suelo estudiado. De acuerdo a los datos se puede estimar el número máximo de grupos diferentes que se podría encontrar en las muestras. Por lo tanto si consideramos que dos clones que exhiben una similitud $\geq$ 99% corresponden al mismo filotipo, entonces el número máximo esperado de grupos o filotipos de AOA es 21. Para una curva de rarefacción del 97% el número máximo estimado es 18 filotipos de AOA.

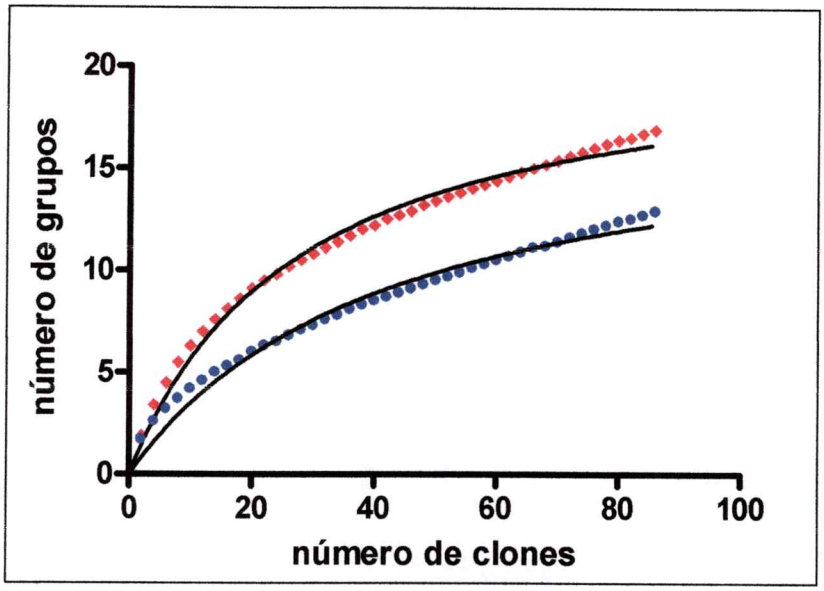

Figura 8. Curva de rarefacción para el gen A-*amoA*. Los puntos en rojo y azul representan los datos para una curva de rarefacción con un 99% y 97% de similitud, respectivamente. La línea negra continua representa el ajuste realizado para una hipérbola en ambos casos, obteniéndose R^2= 0,9892 y 0,9795, respectivamente.

Para determinar la representatividad de arqueas oxidadoras de amonio en la genoteca construida, se calculó el porcentaje de cobertura del muestreo realizado. Para la curva de rarefacción de 99% de similitud se encontraron 17 grupos diferentes (Nx) y en la curva de 97% de similitud entre clones, se obtuvieron 13 (Nx), considerando que el total de clones analizados para ambos casos fue 87 (n), el porcentaje de cobertura es de 81% y 85%, respectivamente.

3.4 Efecto del agua y el acetileno sobre la diversidad del gremio de AOA durante la incubación de los microcosmos

Para evaluar la diversidad de AOA en los diferentes tratamientos a los cuales fue sometido el suelo semiárido, se realizó un análisis mediante T-RFLP utilizando como marcador molecular el gen A-*amoA* y usando las enzimas de restricción *HhaI* y *MnlI*. El análisis se realizó para los tres tratamientos cada 28 días.

Además se incluyó una muestra adicional en el análisis de T-RFLP correspondiente a una mezcla de todos los clones provenientes de la genoteca del gen A-*amoA*, para asociar los T-RFs encontrados en las muestras de los microcosmos con los T-RFs de los clones de la genoteca.

En la Figura 9 se muestran los porcentajes relativos de T-RFs, para ambas enzimas, de las secuencias de los clones que componen la genoteca del gen A-*amoA*. Se puede observar que con la enzima *HhaI* se obtienen 4 T-RFs mientras que con la enzima *MnlI* se obtienen 8. Los perfiles de T-RFLP se corresponden con los datos obtenidos de la digestión *in silico* de los clones, mostrados en la Tabla 3. Además, de esa misma tabla se desprende que la mayoría de los clones con un T-RF de 167 pb en la digestión con *HhaI* concuerda con los T-RFs de 431 pb y 493 pb obtenidos en la digestión con *MnlI*, situación que se ve representada en los gráficos puesto que la suma de los fragmentos obtenidos de la digestión con *MnlI* es similar a la abundancia observada por el T-RF de 167 pb.

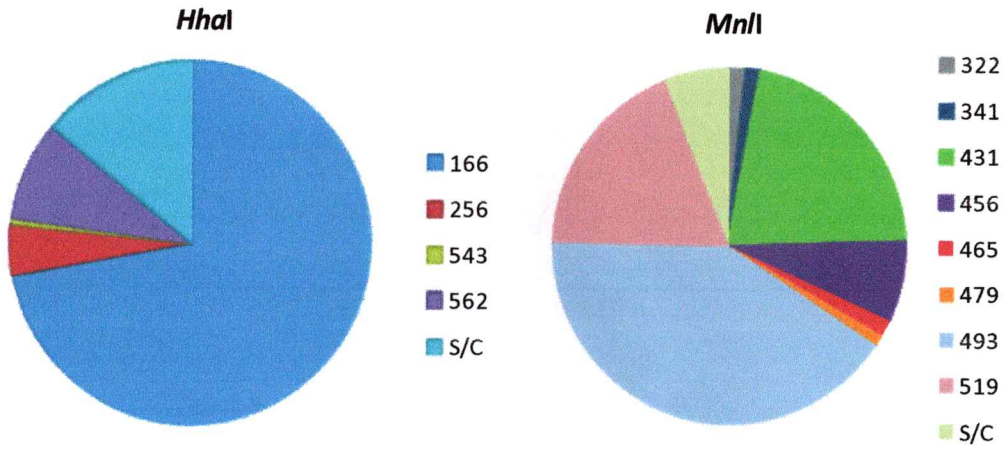

Figura 9. Frecuencias relativas de los T-RFs obtenidos para el gen A-*amoA* de los clones de la genoteca desde el suelo semiárido. S/C corresponde a aquellos T-RFs que presentaron el mismo tamaño que el producto de amplificación del gen A-*amoA* sin digerir (624 pb).

En la Figura 10 se muestran los perfiles de T-RFLP, para ambas enzimas, de acuerdo al tiempo de incubación de los microcosmos con cada uno de los tres tratamientos. Al comparar los T-RFs digeridos con la enzima *MnlI* se puede observar que no existen T-RFs exclusivos para ningún tratamiento; más aún, varios fragmentos de restricción presentan una abundancia similar a lo largo del tiempo de incubación e independientemente del tratamiento. El T-RF de 276 pb disminuye en abundancia en todos los tratamientos, siendo mucho más notoria su disminución en el microcosmos control. Por otro lado, los T-RFs de 322 pb y 493 pb presentan abundancias similares en los tres tratamientos. Por el contrario, el T-RF de 519 pb aumenta su abundancia en los tratamientos donde no se aplicó acetileno (s/R - s/A y c/R - s/A), mientras que disminuye en el tratamiento donde se aplicó acetileno (c/R - c/A). Similar es el caso del fragmento de 456 pb, el cual no se detecta al final de la incubación, en el microcosmos tratado con acetileno (c/R - c/A), y su abundancia

aumenta levemente en los microcosmos no tratados con acetileno (s/R - s/A y c/R - s/A). Por otro lado, la abundancia del fragmento que no presenta sitios de restricción para la enzima de restricción *MnlI* también aumenta en los 3 tratamientos.

En los perfiles obtenidos con la enzima *HhaI*, tampoco existen T-RFs exclusivos para un tipo de tratamiento o periodo de incubación. En general los perfiles de T-RFLP del tratamiento control (s/R - s/A) y del tratamiento con acetileno (c/R - c/A) no presentan diferencias significativas en relación a las abundancias relativas de los distintos T-RFs. Las diferencias se observan en el microcosmos con riego y sin acetileno (c/R - s/A) que corresponde al tratamiento donde se observa nitrificación. En este microcosmos los cambios principales corresponden al tiempo de 28 días de incubación, donde se incrementa notoriamente el T-RF correspondiente al amplicón completo (624 pb) con una disminución concomitante de todos los otros T-RFs.

Cabe destacar que en ambos análisis, con la enzima *HhaI* y *MnlI*, el fragmento terminal con mayor abundancia no se encuentra relacionado con los T-RFs identificados en la genoteca; en el caso de *HhaI* es el T-RF de 459 pb y en el de *MnlI* es el T-RF de 276 pb.

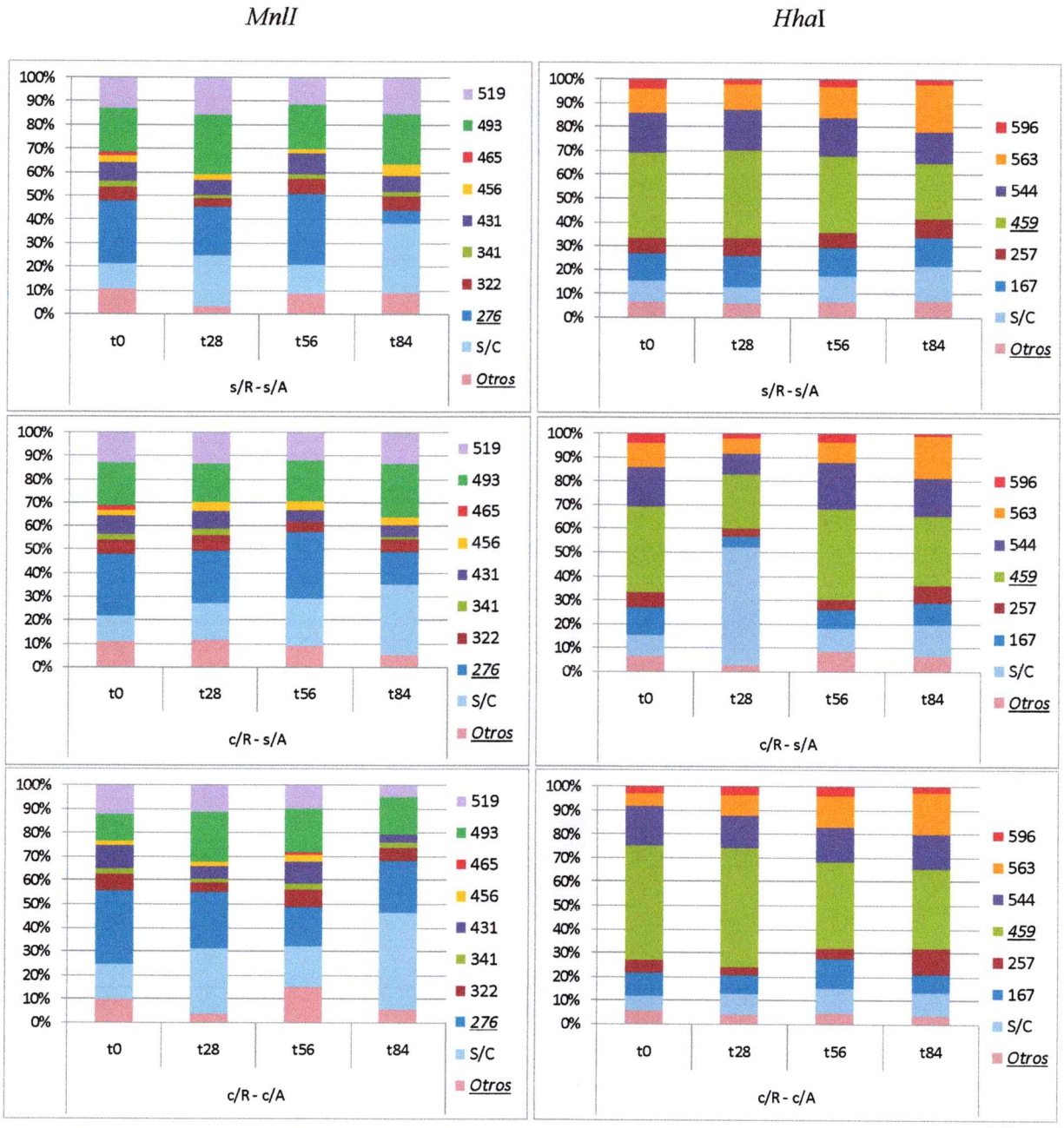

Figura 10. Frecuencias acumuladas de los T-RFs (expresadas como porcentaje relativo de fluorescencia, % UF) obtenidos con las enzimas de restricción *HhaI* y *MnlI*, para el gen A-*amoA* a diferentes tiempos de incubación (t0: 0 días de incubación; t28: 28 días de incubación; t56: 56 días de incubación; t84: 84 días de incubación) de los microcosmos control sin tratamiento (s/R - s/A), los microcosmos sometidos a riego cada 14 días (c/R - s/A) y los microcosmos sometidos a riego cada 14 días y tratados con acetileno (c/R - c/A). En cursiva y subrayados se muestran los T-RFS no representados en la digestión *in silico* de los clones.

Finalmente, se realizó un análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de T-RFLP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos y para cada tratamiento (Figura 11). Este análisis permite determinar qué parámetros edáficos se relacionan con el ordenamiento observado. Los dos primeros ejes del agrupamiento representaron el 30% de la varianza total. Se observa una clara diferencia en la diversidad del gremio de AOA del último tiempo de incubación a lo largo del eje canónico 1. A su vez se observó una tendencia a que estas muestras se separaran por tratamiento a lo largo del eje canónico 2.

El pH y el NO_3^- son los factores que más influyeron sobre el eje canónico 1, con coeficientes de correlación intragrupo de 0,902 y 0,795, respectivamente. Por lo tanto, estas variables dieron cuenta de la separación observada entre los gremios de los tiempos iniciales con respecto a los de los tiempos finales de incubación de los microcosmos a lo largo del eje canónico 1. En cuanto al eje canónico 2, el factor edáfico que más influyó sobre el agrupamiento observado fue el NH_4^+, con un coeficiente de correlación intragrupo de -0,714. Este factor explicaría la separación observada entre las muestras de los tiempos finales de incubación según el tratamiento a lo largo del eje canónico 2

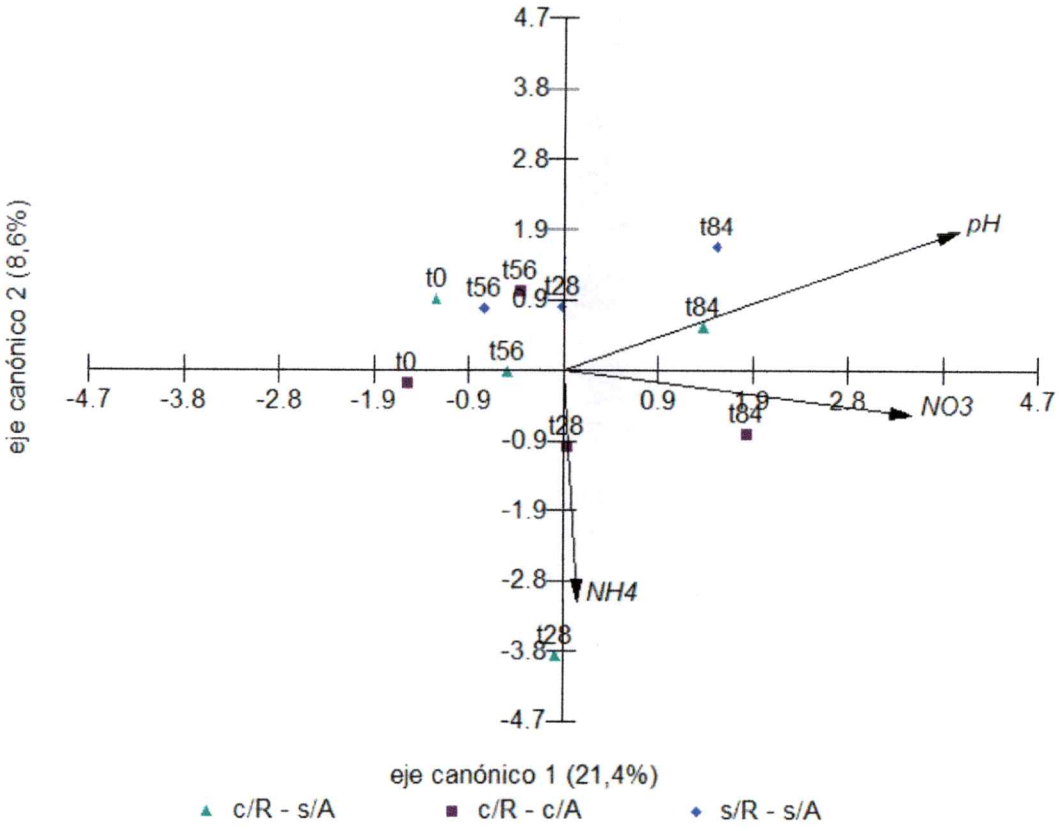

Figura 11. Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de TRFLP del gen A-*amoA* y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos. Tratamientos: microcosmos control sin tratamiento (s/R - s/A), microcosmos sometidos a riego cada 14 días (c/R - s/A) y microcosmos sometidos a riego cada 14 días y tratados con acetileno (c/R - c/A). Tiempos: t0: 0 días de incubación; t28: 28 días de incubación; t56: 56 días de incubación; t84: 84 días de incubación. Parámetros edáficos: pH; contenido de amonio (NH_4^+) y contenido de nitrato (NO_3^-).

4.- DISCUSIÓN

4.1 Efecto del agua y el acetileno sobre la actividad de nitrificación durante la incubación de los microcosmos

La nitrificación es un proceso central en el ciclo del nitrógeno, ya que regula los contenidos de amonio y nitrato. Diversos factores se han descrito que afectan el proceso de oxidación del amonio en el suelo, entre ellos el bajo contenido hídrico es una de las mayores limitaciones en suelos áridos (Otter y Scholes, 2005). Es así, como en ecosistemas áridos que experimentan breves episodios de hidratación como los "florecimientos" en el Desierto de Atacama, aparecen asociados a una mayor actividad de nitrificación en el suelo (Orlando y col., 2010).

En el caso de los microcosmos de este trabajo, el contenido de NH_4^+ y NO_3^- se determinó para los 3 tratamientos semanalmente, y los valores son similares a los obtenidos previamente con muestras del mismo suelo sometido a las mismas condiciones de incubación (con riego y sin riego) (Bustamante, 2010). La mayor disponibilidad de agua favorece la actividad de nitrificación reflejada en un aumento en la concentración de nitrato asociada a una disminución de amonio.

Por otra parte los resultados muestran que las mayores concentraciones de amonio a lo largo de la incubación se observan siempre en los microcosmos tratados con acetileno (c/R - c/A), el cual está descrito como un inhibidor de la oxidación autótrofa de amonio (Hyman y Wood, 1985). Además, se puede observar que en todos los tratamientos existen fluctuaciones más o menos cíclicas del contenido de amonio, que constituye el sustrato de la nitrificación.

En el ciclo del nitrógeno el amonio se produce por distintas vías, una de ellas es por fijación de nitrógeno molecular, el cual es oxidado a amonio y la otra vía es por amonificación de la materia orgánica presente en el suelo. En los microcosmos estudiados, el contenido de nitrógeno combinado en el suelo (en forma de amonio, nitrato o nitrógeno orgánico) podría ser suficiente para sustentar el crecimiento bacteriano; por lo tanto bajo estas condiciones de nitrógeno no limitante, la fijación de nitrógeno no está favorecida. Por otro lado, es más probable que el amonio presente en los microcosmos se genere por amonificación de la materia orgánica debido a la degradación de compuestos orgánicos nitrogenados tales como proteínas o ácidos nucleicos, como se observó previamente (Espinosa, 2007). Cabe destacar que en todos los tratamientos se observaron estas fluctuaciones dando cuenta de que la descomposición de la materia orgánica es un proceso normal en todos los microcosmos bajo las distintas condiciones de tratamientos (Figura 12).

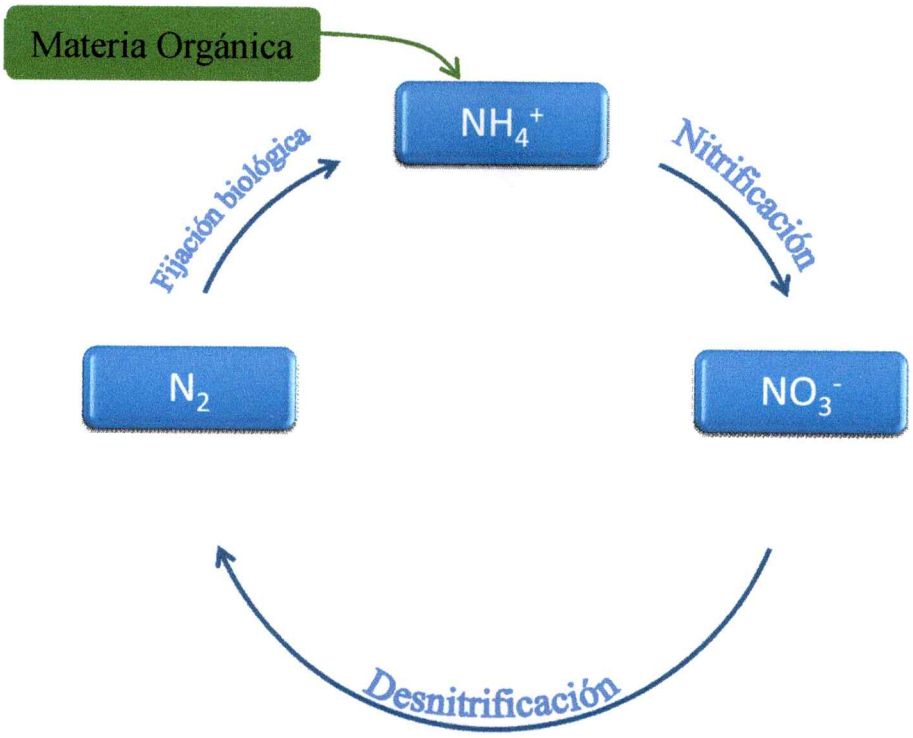

Figura 12. Diagrama del ciclo del nitrógeno incluyendo el proceso de amonificación (en verde).

En los microcosmos tratados con acetileno (c/R - c/A) se observa la actividad inhibitoria de este gas sobre la nitrificación autotrófica, que se traduce en un bajo contenido de NO_3^- durante la mayor parte de la incubación y que sólo aumentó en el día 63, comparado con el tratamiento sin acetileno (c/R - s/A) que presentó un aumento sostenido del NO_3^- desde el inicio de la incubación. El aumento en el contenido de NO_3^- al final de la incubación del microcosmos tratado con acetileno podría ser explicado por una oxidación del amonio no-autotrófica que no es inhibida por acetileno. Diversos autores han descrito que el amonio podría ser oxidado por microorganismos heterótrofos, ya sea bacterianos o fúngicos (Hayatsu y col., 2008; Kowalchuk y Sthephen, 2001).

Con respecto a los valores de pH, éstos se mantuvieron cercanos a la neutralidad a lo largo de la incubación, con una leve tendencia a aumentar hacia el final de la incubación. De acuerdo a estos datos se espera que las variaciones observadas en la actividad de nitrificación no sean consecuencia del cambio de pH sino efecto de los tratamientos aplicados. Erguder y col. (2009) señalan que las AOA se encuentran en un amplio rango de pH. Sin embargo, en suelos, las AOA se han descrito en su mayoría asociadas a suelos forestales o agrícolas con pHs en el rango de 5-8 (Boyle-Yarwood y col., 2008; Leiniger y col., 2006).

4.2 Efecto del riego sobre la abundancia de las comunidades oxidadoras de amonio durante la incubación de los microcosmos

De acuerdo a los resultados obtenidos y resumidos en la Tabla 3, se puede concluir que en estos suelos las BOA son dominantes con respecto a las AOA, y que los tratamientos aplicados mantienen esta dominancia. No obstante, la abundancia de la comunidad de arqueas oxidadoras de amonio aumentó con la mayor disponibilidad de agua, evidenciando que el riego induce el crecimiento de ambas comunidades, AOA y BOA, siendo el efecto notablemente mayor en estas últimas. Estos datos sugieren que las BOA tendrían una mayor participación en la actividad nitrificante observada en los microcosmos con mayor hidratación. Resultados similares fueron reportados por Jia y Conrad (2009), quienes observaron que en microcosmos estimulados por amonio e inhibidos por acetileno los cambios en la actividad nitrificante fueron paralelos a los cambios de abundancia de BOA, pero no cambió la abundancia de AOA. Sin embargo, otros autores han observado, en ensayos de microcosmos de suelos agrícolas, que la oxidación del amonio es

mayoritariamente debida a la actividad de las AOA (Offre y col., 2009; Tourna y col., 2008; Nicol y col., 2008; He y col, 2007; Leininger y col., 2006).

Por otro lado, las unidades génicas de las BOA determinadas al inicio de la incubación, son similares a los resultados obtenidos en los trabajos mencionados anteriormente, es decir, del orden de 10^5 - 10^7 copias del gen bacteriano por gramo de suelo. Sin embargo, no ocurre lo mismo al comparar la abundancia del gen A-*amoA*, ya que el resultado obtenido en este trabajo es menor (aprox. 10^3 por gramo de suelo) al reportado en la bibliografía (10^6 - 10^7 por gramo de suelo). Estas diferencias podrían deberse a la metodología empleada en esta memoria (NMP-PCR) que es menos sensible, comparado con el PCR en tiempo real. Cabe señalar que estos resultados de abundancia no son totalmente comparables con los datos de la literatura ya que en esta memoria se utilizaron partidores diferentes a los empleados por los autores anteriormente mencionados.

Considerando entonces que el gremio bacteriano de oxidadores de amonio es predominante en este suelo, es a este gremio al cual se podría atribuir el proceso de nitrificación observado en el tratamiento sin acetileno (c/R - s/A).

En base a los resultados obtenidos del NMP-PCR y de la medición de parámetros edáficos se puede observar que existe cierta congruencia con algunas observaciones descritas por Erguder y col. (2009); por ejemplo el pH en este tipo de suelo podría estar relacionado con la baja presencia del gen A-*amoA*. En este suelo semiárido del matorral esclerófilo, el pH no fue menor a 6,3, valor al cual la predominancia estaría dada por el gremio bacteriano según lo descrito por Prosser y Nicol (2008), Erguder y col. (2009) y los resultados obtenidos por Nicol y col. (2008). Otro factor descrito en Eguder y col (2009) es el contenido de fósforo, el cual presenta una correlación negativa con la comunidad AOA y

positiva con la comunidad BOA, para el caso de este suelo y como se registró en un trabajo anterior (Espinosa, 2007), el contenido de fósforo disponible se encuentra en un rango elevado favoreciendo el nicho de las bacterias oxidadoras de amonio.

4.3 Composición de la comunidad de arqueas oxidadoras de amonio.

La genoteca del gen A-*amoA* obtenida en este trabajo consta en su totalidad de clones que se asocian a secuencias de clones pertenecientes a otros suelos estudiados. El dendrograma construido con el índice de distancia de Jukes and Cantor (Figura 7), muestra a todas las secuencias de los clones provenientes del suelo semiárido agrupadas en un cluster separadas e independientemente de muestras provenientes de aguas y profundidades marinas, coincidentemente con lo descrito anteriormente (Prosser y Nicol, 2008). La distribución de las secuencias obtenidas en este trabajo y otras de la base de datos muestra que éstas se agrupan en hábitats específicos (suelo, mar, ambientes extremos). También se puede observar que ciertos haplotipos identificados por RFLP, utilizando la enzima de restricción *Hha*I, se encuentran como grupos en el dendrograma, éstos corresponden al haplotipo A y B (los cuales presentan la mayor cantidad de representantes en la genoteca); más aun, en el grupo en donde se encuentran los clones asociados al haplotipo A también se encuentran otros clones. Esto da cuenta de la sensibilidad de las dos metodologías, porque mientras en el RFLP el agrupamiento se realiza por los diferentes patrones de corte que presenta una enzima determinada, el análisis de agrupamiento se realiza en base a toda la secuencia de cada clon. Es así como la diferencia en un nucleótido puede determinar la diferencia entre dos perfiles de restricción, mientras que el análisis de toda la secuencia

puede generar que dos secuencias que presentan diferente perfil de restricción se agrupen debido al alineamiento de la totalidad de la secuencia.

Por otro lado, al evaluar si el muestreo realizado alcanzó a abarcar la totalidad de la comunidad, el número de clones analizados indica que se logró un 85% de cobertura con un 97% de similitud, lo cual es un valor comparable con otros estudios realizados (Auguet y col., 2010; Hansel y col., 2008).

4.4 Análisis de la diversidad de la comunidad de arqueas oxidadoras de amonio durante la incubación de los microcosmos

Los perfiles de T-RFLP obtenidos para los distintos microcosmos, revelan la presencia de la mayoría de los fragmentos que se esperan, de acuerdo al análisis de restricción *in silico* de los clones de la genoteca del gen A-*amoA*. No obstante, los perfiles de T-RFLP de los microcosmos muestran mayor riqueza de T-RFs comparada con los perfiles de T-RFs obtenidos a partir de una mezcla de los clones de la genoteca. También se puede observar que la aplicación de riego y/o de una atmósfera con acetileno al suelo de los microcosmos produce cambios en la abundancia de T-RFs, pero no en la riqueza, puesto que no se observa la aparición de filotipos nuevos. Un comportamiento similar se observó al analizar los perfiles de DGGE en los trabajos de Jia y Conrad (2009) donde a pesar de aplicar 100 Pa de acetileno, el patrón de bandas en la electroforesis se conserva en los diferentes tratamientos, concluyendo que la aplicación de acetileno no produce cambios en la comunidad de arqueas oxidadoras de amonio. Similares resultados fueron obtenidos por Shen y col. (2008) en suelos alcalinos, donde el patrón de DGGE no presentó cambios para

el gen A-*amoA*. Por el contrario, en el trabajo de He y col. (2007), en suelos ácidos, se observaron claros cambios en la composición de AOA los cuales podrían ser atribuidos al pH de los suelos estudiados. En concordancia con lo anterior, el trabajo de Nicol y col. (2008) demuestra que el pH es un factor determinante en la selección de nichos para las comunidades bacterianas y arqueales.

Coincidentemente, al analizar la relación que existe entre los parámetros edáficos medidos (contenido de NO_3^-, contenido de NH_4^+ y pH) y los perfiles de T-RFLP obtenidos en los microcosmos, se observa que existe una separación de los gremios de los tiempos iniciales con respecto al periodo final de incubación de las muestras, y que esta separación está explicada principalmente por el pH y el contenido de NO_3^-, y no por el tipo de tratamiento aplicado. Según Fierer y Jackson (2006), el pH sería el parámetro edáfico considerado como el mejor descriptor y predictor de la estructura de las comunidades. Por lo tanto sería determinante en la distribución de las AOA respecto de las BOA (Erguder y col., 2009; Nicol y col., 2008).

5.- CONCLUSIONES

1. El incremento en la disponibilidad de agua favorece la actividad nitrificante del suelo semiárido en los microcosmos; mientras que la aplicación de acetileno inhibió este proceso durante la incubación de los microcosmos.

2. En el suelo semiárido proveniente del matorral esclerófilo de Chile existe mayor abundancia de bacterias oxidadoras de amonio comparado con su contraparte arqueal. Sin embargo, el incremento en la disponibilidad de agua favoreció el crecimiento de ambos gremios, aunque no en la misma magnitud.

3. La composición del gremio de arqueas oxidadoras de amonio del suelo semiárido comprende a clones relacionados con secuencias derivadas de suelos y con *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, crenarqueota mesófila proveniente de suelo. Los clones obtenidos se separan de arqueas oxidadoras de amonio de otros ambientes.

4. Los perfiles de T-RFLP sugieren que la adición periódica de agua y la aplicación de acetileno provocan un cambio en la abundancia de algunos T-RFs, mientras que no se observan cambios en la riqueza del gremio de arqueas oxidadoras de amonio.

6.- BIBLIOGRAFÍA

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

Auguet J.C., Barberan A., Casamayor E.O. 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. ISME J. 4:182-190.

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

Belser L.W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 33:309-33.

Berg P., Klemedtssn L., Rosswall T. 1982. Inhibitory effect of low partial pressures of acetylene on nitrification. Soil Biol. Biochem. 14: 301-303.

Bintrim S.B., Donohue T.J., Handelsman J., Roberts G.P., Goodman R.M. 1997. Molecular phylogeny of Archaea from soil. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:277-282.

Boyle-Yarwood S.A., Bottomley P.J., Myrold D.D. 2008. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stand of red alder and Douglas fir in Oregon. Environ. Microbiol. 10:2956-2965.

Buckley D.H., Graber J.R.,Schmidt T.M. 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeote and their diversity and abundance in soils. Appl. Environ. Microbiol. 64:4333-4339

Bustamante M. 2010. Efecto de la disponibilidad de agua sobre la diversidad de bacterias oxidadoras de amonio de suelos áridos. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 64 pp.

Cocharan, W. G. 1950. Estimation of bacterial densidies by means of the most probable number. Biometrics 105:116.

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

Degens B.P., Sparling G.P. 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.

Degrange V., Coûteaux M.M., Anderson J. M., Berg M. P., Lensil R. 1998. Nitrification and occurrence of *Nitrobacter* by MPN-PCR in low and high nitrifying coniferous forest soils. Plant Soil 198:201-208.

de la Torre J.R., Walker C.B., Ingalls A.E., Könneke M., Stahl D.A. 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. Environ. Microbiol. 10:810-818.

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

Erguder T.H., Boon N., Wittebolle L., Marzorati M., Verstraete W. 2009. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. FEMS Microbiol. Rev. 33:855-69.

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

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

Forster J.C. 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

Francis C.A., Beman J.M., Kuypers M.M. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. ISME J. 1:19-27.

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

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

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

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

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Sym. Series 41: 95-98.

Hansel C.M., Fendorf S., Jardine P.M., Francis C.A. 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. Appl. Environ. Microbiol. 74:1620-1633.

Hatzenpichler R., Lebedeva E.V., Spieck E., Stoecker K., Richter A., Daims H., Wagner M. 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105:2134-2139.

Hayatsu M., Tago K., Saito M. 2008. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. Soil Sci. Plant Nut. 54:33-45.

He J.Z., Shen J.P., Zhang L.M., Zhu Y.G., Zheng Y.M., Xu M.G., Di H. 2007. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. Environ. Microbiol. 9:2364-74.

Holland S.M. 2003. Analytic Rarefaction 1.3. www.uga.edu/strata/software/index.html

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

Housman D.C., Powers H.H., Collins A.D., Belnap J. 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.

Hyman M.R. and Wood P.M. 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. Biochem. J. 227:719-725.

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

Junier P., Molina V., Dorador C., Hadas O., KimO., Junier T., Witzel K., Imhoff J.F. 2010. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85:425-440.

Jurgens G., Lindström K., Saano A. 1997. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. Appl. Environ. Microbiol. 63:803-805.

Klepac-Ceraj V., Ceraj I., Polz M.F. 2006. Clusterer: extendable java application for sequence grouping and cluster analyses. Online J. Bioinformatics 7:15-21.

Könneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature 437:543-546.

Kowalchuk G.A., Stephen J.R. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a Model for Molecular Microbial Ecology. Annu. Rev. Microbiol. 55:485–529.

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

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

Luan X., Chen J., Liu Y., Li Y., Jia J., Liu R., Zhang X.H. 2008. Rapid quantitative detection of Vibrio parahaemolyticus in seafood by MPN-PCR. Curr. Microbiol. 57:218-221.

Mäntynen V., Niemelä S., Kaijalainen S., Pirhonen T., Lindström C. 1997. MPN-PCR quantification method for staphylococcal enterotoxin c 1 gene from fresh cheese. Int. J. Food Microbiol. 36:135.143.

Nelson D.W. 1983. Determination of ammonium in KCl extracts by the salicylate Method. Commun. Soil Sci. Plant Anal 14:1051-1062.

Neilan B.A., Leigh D.A., Rapley, E., McDonald, B.L. 1994. Microsatellite Genome Screening: Rapid Nondenaturing, Non-Isotopic Dinucleotide Repeat Analysis. Biotechniques 17:708-712.

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

Nicol G.W., Schleper C. 2006. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? Trends Microbiol. 14:207-212.

Nicol G.W., Tscherko D., Embley T.M., Prosser J.I. 2005. Primary succession of soil Crenarchaeota across a receding glacier foreland. Environ. Microbiol. 7:337-347.

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

Otter L., Scholes M. 2005. Biogenic fluxes of carbon and nitrogen in arid and semiarid ecosystem. Geophys. Res. Abstr. 7:09593.

Orlando J., Alfaro M., Bravo L., Guevara R., Carú M. 2010. Bacterial diversity and occurrence of ammonia-oxidizing bacteria in the Atacama Desert soil during a "desert bloom" event. Soil Biol. Biochem. 42:1183-1188

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

Philippot L. 2002: Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. Biochem. Biophys. Acta 1577:355-376.

Prosser J.I., Nicol G.W. 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. Environ. Microbiol. 10:2931-2941.

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

Rappé M.S., Giovannoni S.J. 2003. The uncultured microbial majority. Annu. Rev. Microbiol. 57:369-394.

Roberts G.P., Brill W.J. 1981. Genetics and regulation of nitrogen fixation. Annu. Rev. Microbiol. 35:207-35.

Rotthauwe J.H., Witzel K.P., Liesack W. 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.

Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.

Sambrook J,Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning - a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

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

Schleper C., Holben W., Klenk H.P. 1997. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments.Appl. Environ. Microbiol. 63:321-323.

Seneviratne R., Wild A. 1985. Effect of mild drying on the mineralization of soil nitrogen. Plant Soil 84:175-179.

Sharma S., Radl V., Hai B., Kloos K., Fuka M.M., Engel M., Schauss K., Schloter M. 2007. Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. J. Microbiol. Meth. 68:445-452.

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

Shoun H., Kim D.H., Uchiyama H. and Sugiyama J. 1992. Denitrification by fungi. FEMS Microbiol. Lett. 73:277-281.

Singh B.K., Munro S., Reid E., Ord B., Potts J.M., Paterson E., Millard P. 2006. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. Eur. J. Soil Sci. 57:72-82.

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

Tamura K., Kumar S., Dudley J., Nei M. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24:1596-1599.

Torsvik V., Ovreas L., Thingstad T.F. 2002. Prokaryotic diversity magnitude dynamics, and controlling factors. Science 296:1064-1066.

Tourna M., Freitag T.E., Nicol G.W.,Prosser J.I. 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. Environ. Microbiol.10:1357-1364.

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

Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., Fouts D.E., Levy S., Knap A.H., Lomas M.W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y.H., Smith H.O. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science. 304:66-74

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

Yang J.E., Skogley E.O., Schaff B.E., Kim J.J. 1998. Simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. Soil Sci. Soc. Am. J. 62:1108-1115.

Yeager C.M., Northup D.E., Grow C.C., Barn S.M., Kuske C.R. 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.

Young J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, p. 43-86. In G. Stacy, R.H. Burris and H.J Evans (eds.), Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall, New York, N.Y.

Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M., Steward G.F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. Environ. Microbiol. 5:539-554.

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

Zumft W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:533-616.