

UCH-Fe
Biotecnología
E-93c
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS

**COMPOSICIÓN DE LOS GREMIOS BACTERIANOS DEL CICLO
DEL NITRÓGENO EN EL SUELO SEMIÁRIDO DEL
MATORRAL ESCLERÓFILO DE CHILE CENTRAL**

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



Catalina Andrea Zúñiga Taulis

Octubre, 2008

Santiago-Chile

Director de Seminario de Título: Dra. Margarita Carú Marambio

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
MEMORIA DE TITULO

Se informa a la Escuela de Ciencias de la Facultad de Ciencias que la Memoria de Título presentada por la candidata:

CATALINA ANDREA ZÚÑIGA TAULIS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular en el examen de Defensa de la Memoria rendido el día 7 de Noviembre del año 2008.

Director de memoria de título:

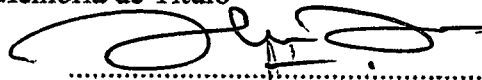
Dra. Margarita Carú Marambio



.....


Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Carlos Jerez



.....

Dr. Francisco Chávez



.....



RESEÑA BIOGRÁFICA



Nací en la ciudad de Santiago el 19 de Junio de 1983. Toda mi enseñanza escolar transcurrió en el Colegio Lo Castillo donde siempre me destacué por ser una buena alumna, interesada principalmente en el área científica por sobre la humanista.

Durante mis años de enseñanza media nunca tuve muy claro qué podía estudiar que llenara todos mis intereses y expectativas. Fue en IV medio cuando escuché hablar de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile. Leyendo la malla curricular me di cuenta de que era lo más adecuado para mis intereses y me decidí a postular, matriculándome el año 2001.

En el 2005 ingresé al laboratorio de Ecología Microbiana con la Dra. Margarita Carú, en donde realicé mi Unidad de Investigación y posteriormente mi Seminario de Título.

Egresé de la Universidad de Chile como Licenciada en Biotecnología el año 2006 y me titulé de Ingeniera en Biotecnología Molecular en el mes de Noviembre del año 2008.

DE TUS PAPÁS Y HERMANOS...

Qué difícil hija mía. Teniendo tú tantas cualidades, conociendo tus características, es complicado pensar en transcribir tantas cosas en un papel. Sin embargo, e intentando al mismo tiempo ser breve, trataré de retratar desde mi punto de vista paterno la etapa a la cual llegas hoy, procurando no dejarme llevar parcialmente por mi orgullo y satisfacción de padre que te ama por sobre todas las cosas de la vida.

Siempre has sido parte del tesoro familiar, valiosa para mí, tu mamá y tus hermanos; distinta, independiente, perfecta, excepcional, la mejor en sus estudios, sorprendente, sobre todo cuando siendo aún chiquitita y nosotros sin presionarte fuimos testigos que te salías de los esquemas tradicionales, optando por valores personales trascendentes y necesarios como el respeto, la responsabilidad y el amor al prójimo, cuestiones difíciles en estos días de crisis de valores.

Por otra parte, la mujer transparente, humilde, reservada, cauta, sensata y comprensiva.

Amante de la naturaleza, la ecología, los animales, los desvalidos.

¡Qué difícil Caty! Poder definirte siendo tan especial.

De todo lo anterior deriva para nosotros tus padres y hermanos, el orgullo, la ventura, la satisfacción y la complacencia de verte feliz, exitosa, emprendedora y soñadora, como así también no dudar sobre tu éxito futuro, pues sin proponértelo combinas en forma natural y admirable todas estas cualidades que hacen que las personas alcancen el triunfo y la excelencia.

Es así también como nos complace de sobremanera que estés llegando al fin de tu carrera de Biotecnología, en la cual deseamos logres todo el éxito que te mereces y obtengas a través de ella triunfos y satisfacciones, reconociendo y solicitando tu perdón por no haber entendido en principio de qué se trataba y sugerirte, quizás, que optaras por otros caminos.

Te queremos y cuenta siempre con nosotros.

Papá



A MI QUERIDA FAMILIA...



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al proyecto FONDECYT 1040880 por el apoyo económico para la realización de ésta Tesis.

A mi tutora de tesis, la Dra. Margarita Carú por permitirme trabajar en su laboratorio, por su amabilidad, por todo su tiempo, conocimiento y por su invaluable ayuda académica.

A mis compañeros y ex compañeros de laboratorio: Juanita, Fernanda, Natalia, Valentina, José, Mauricio y Marco por hacer del laboratorio un lugar agradable de trabajo. Gracias especiales a Julieta por su ayuda en la corrección de las versiones preliminares de este Seminario.

Un agradecimiento muy especial a Lorena Bravo, con quien realicé gran parte del trabajo experimental.

A Rafael Guevara por su eterna sonrisa y buena disposición para resolver todas mis dudas tanto a nivel experimental como teórico.

A mis compañeros de carrera por haberle dado un toque de alegría a estos años de estudio.

A mis grupo de viajes Telcontari, por estar siempre preocupados del desarrollo de mi tesis y por entregarme algunos de los mejores momentos de mi vida.

A mi familia, Tía Mari, Carolina, tía Gladys y Pauli por su constante apoyo y estímulo.

A mi gata Kiara por hacerme feliz.

A mi abuela Nany que siempre ha creído en mí y en mis capacidades y me ha apoyado en todo lo que me he propuesto.

A mis hermanos María José y Emilio por su infinito apoyo, cariño y, sobretodo, paciencia.

Finalmente mis mayores agradecimientos son para mis papás, Florita y Juan, por todo su amor, apoyo, paciencia y confianza aunque nunca hayan tenido muy claro qué es lo que estoy estudiando. Los adoro y este logro es para ustedes.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	11
1. Localidad y colecta de las muestras	11
2. Medios de cultivo y aislamiento de las bacterias	11
2.1. Bacterias Desnitrificantes (BDN)	11
2.2. Bacterias Oxidadoras de Amonio (BOA)	12
3. Extracción del DNA	13
3.1. Obtención del DNA a partir de los cultivos	13
3.2. Obtención del DNA a partir de las muestras de suelo	13
4. Amplificaciones por PCR	14
4.1. Amplificación del gen funcional <i>nifH</i>	14
4.2. Amplificación del gen ribosomal 16S (rDNA 16S)	17
4.3. Amplificación del gen ribosomal 16S específico para β proteobacterias	17
4.4. Amplificación del gen funcional <i>nosZ</i>	18
4.5. Amplificación del gen funcional <i>nirS</i>	18

5. Purificación de los productos de PCR	19
6. Clonación y secuenciación de los amplificados	19
7. Perfiles de RFLP- PCR	20
8. Análisis de los datos	21
RESULTADOS	22
1. Composición del gremio fijador de nitrógeno en el suelo y la rizósfera	22
1.1. Amplificación del gen <i>nifH</i> a partir de las muestras de suelo	22
1.2. Clonación del gen <i>nifH</i>	23
1.3. Determinación de la diversidad bacteriana mediante el ensayo de RFLP	24
1.4. Determinación de la diversidad bacteriana mediante la secuenciación del gen <i>nifH</i>	25
2. Composición del gremio de oxidadores de amonio en el suelo y la rizósfera	28
2.1. Análisis de las BOA mediante la amplificación y clonación del gen ribosomal 16S de β proteobacterias a partir de muestras ambientales	28
2.1.1. Caracterización de los clones mediante perfiles de RFLP de un fragmento del gen ribosomal 16S de las β proteobacterias amplificado por PCR	30
2.2. Análisis de las BOA mediante aislamiento y cultivo	33

2.2.1. Caracterización de las colonias aisladas mediante perfiles de RFLP de un fragmento del gen ribosomal 16S de β proteobacterias amplificado por PCR	33
2.3. Determinación de la diversidad bacteriana mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S de las β proteobacterias a partir de los clones y las colonias aisladas	36
3. Composición del gremio de BDN del suelo y la rizósfera actinorrícica	44
3.1. Cultivo y aislamiento de los microorganismos desnitrificantes	44
3.2. Amplificación del gen <i>nosZ</i>	45
3.3. Amplificación del gen ribosomal 16S a partir de los aislados obtenidos	47
3.4. Análisis de los cultivos desnitrificantes mediante RFLP	48
3.5. Identificación de los cultivos desnitrificantes mediante la secuenciación del gen <i>nosZ</i> y del gen para el RNA ribosomal 16S	50
3.6. Amplificación y secuenciación del gen funcional <i>nirS</i>	52
DISCUSIÓN	53
1. Diversidad genética del gremio de las bacterias fijadoras de nitrógeno	53

2. Diversidad genética del gremio de las bacterias nitrificantes	58
3. Diversidad genética del gremio de las bacterias desnitrificantes	60
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados en este estudio	16
Tabla 2. Resultado de la clonación del gen <i>nifH</i>	23
Tabla 3. Abundancia relativa de los diferentes haplotipos del gen <i>nifH</i>	25
Tabla 4. Resultado de la clonación del gen 16S rDNA de β proteobacterias	30
Tabla 5. Abundancia relativa de los diferentes haplotipos del gen 16S rDNA de las β proteobacterias	32
Tabla 6. Amplificación del gen 16S rDNA de las β proteobacterias a partir de los cultivos	34
Tabla 7. Abundancia relativa de los diferentes haplotipos del gen 16S rDNA de β proteobacterias a partir de los cultivos aislados	36
Tabla 8. Producción de gas a partir de los cultivos DNB aislados	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Visión general del ciclo del nitrógeno	2
Figura 2. Ubicación geográfica del sitio de muestreo	11
Figura 3. Productos de la amplificación para el gen <i>nifH</i>	22
Figura 4. Resultado de la clonación del gen <i>nifH</i>	24
Figura 5. Árbol filogenético para el gen <i>nifH</i>	26
Figura 6. Amplificación del gen 16S rDNA específico para β proteobacterias	29
Figura 7. Patrones de RFLP de los clones de BOA	31
Figura 8. Patrones de RFLP de los cultivos de BOA	35
Figura 9. Árbol filogenético para el gen 16S rDNA específico de las β -proteobacterias	38
Figura 10. Árbol filogenético para el gen 16S rDNA de las BOA	40
Figura 11. Árbol filogenético para el gen 16S rDNA de β proteobacterias de las bacterias aisladas y cultivadas	42
Figura 12. Ensayo de producción de gas	45
Figura 13. Productos de la amplificación del gen <i>nosZ</i>	46
Figura 14. Productos de la amplificación del rDNA 16S de cultivos	47
Figura 15. Patrones de RFLP de los cultivos desnitrificantes	49
Figura 16. Dendrograma mostrando las relaciones de las secuencias de los genes <i>nosZ</i> y 16S rDNA	51
Figura 17. Dendrograma mostrando las relaciones entre las secuencias del gen <i>nirS</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS

BFN: Bacterias fijadoras de nitrógeno

BOA: Bacterias oxidadoras de amonio

BON: Bacterias oxidadoras de nitrito

BSA: Seroalbúmina bovina.

BLASTN: Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide.

dNTP: Deoxirribonucleótido trifosfato.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

FBN: Fijación Biológica de Nitrógeno

PCR: Polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

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

TE: Tris-HCl-EDTA

TAE: Tris- ácido acético – EDTA.

Tris: Tris (hidroximetil) aminoetano.

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

RESUMEN

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno depende principalmente de la actividad de los microorganismos. La composición y estructura de la comunidad microbiana del suelo está fuertemente afectada por la presencia de plantas, estableciendo diferencias entre la microbiota asociada a la rizósfera y aquella presente en el suelo sin cobertura vegetal. El propósito del trabajo fue estudiar la composición de los gremios funcionales del ciclo del nitrógeno en el suelo del matorral esclerófilo correspondiente a: fijadores de nitrógeno, oxidadores de amonio y desnitrificadores tanto asociados a la rizósfera de la planta actinorríca *Colletia hystrix* como al suelo sin cobertura vegetal. Para ello se realizaron identificaciones tanto dependientes como independientes de cultivo. Esta última se llevó a cabo mediante la amplificación directa a partir de muestras del suelo, clonación y el análisis de la secuencia de los genes *nifH*, 16S rDNA específico para β proteobacterias y *nosZ*. El aislamiento y el cultivo sólo dieron resultados positivos para el gremio de las bacterias desnitrificantes y la identificación de éstas se realizó por análisis de la secuencia de los genes *nosZ*, 16S rDNA y *nirS*.

En todos los casos donde la amplificación de los genes fue positiva, éstos se secuenciaron y analizaron filogenéticamente. Los resultados obtenidos muestran que los clones de los fijadores de nitrógeno obtenidos a partir de la rizósfera de *C. hystrix* se relacionan principalmente con bacterias rizobiales de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y bacterias del género *Azospirillum*. El análisis de los clones no mostró patrones de RFLP comunes entre aquellos obtenidos de la rizósfera y el suelo sin cobertura vegetal. Los clones de fijadores de nitrógeno obtenidos desde el suelo

son poco diversos comparados con la rizósfera ya que se relacionan sólo con las bacterias del género *Azospirillum* y sólo dos patrones de RFLP agrupan el 72% de los clones obtenidos.

En el caso de los clones de oxidadores de amonio, éstos se agrupan principalmente con las bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira*. No fue posible obtener cultivos que se relacionen con bacterias oxidadoras de amonio; la mayoría de los cultivos obtenidos se asoció con las bacterias del género *Pseudomonas*, lo cual corrobora la dificultad para cultivarlos en medios sintéticos. Para el grupo funcional de los desnitrificadores obtenidos a partir de cultivo, la identificación a través de los marcadores moleculares *nosZ*, 16S rDNA y *nirS* revela que ellos se relacionan con las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Ralstonia*.

ABSTRACT

The nitrogen biogeochemical cycle depends mostly on the microbial activity. The composition and structure of the soil microbial community is strongly affected by the presence of plants, establishing differences between the microbiota associated to the rhizosphere and that present in soil without plant cover. The purpose of the work was to study the composition of the functional guilds of the nitrogen cycle of the sclerophyll matorral corresponding to: nitrogen fixers, ammonia oxidizers and denitrifiers associated with both the actinorhizal plant *Colletia hystrix* and soil without plant cover. To achieve that, a culture-dependent and culture-independent identification was performed. In the culture-independent identification process, *nifH*, 16S rDNA specific for β proteobacteria and *nosZ* genes were amplified directly from soil samples, cloned and sequenced. The isolation and culture only gave positive results for the denitrifying guild and their identification was performed by a sequence analysis of the *nosZ*, 16S rDNA and *nirS* genes.

In all cases where the amplification of the genes was positive, they were sequenced and phylogenetically analysed. The results showed that the nitrogen fixing clones obtained from the *C. hystrix* rhizosphere were mostly related to rhizobial bacteria from the *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* genera and to the *Azospirillum* genera. The clone analysis did not show common RFLP patterns between those obtained from the rhizosphere and the soil without plant cover. The nitrogen fixing clones from the soil without plant cover were not as diverse when compared with the rhizosphere clones because they were only related to bacteria from the *Azospirillum* genera and only two RFLP patterns grouped 72% of the clones obtained.

In the case of the ammonia oxidizing clones, they were mostly associated to bacteria from the *Nitrosomonas* and *Nitrospira* genera. It was not possible to obtain cultures related to ammonia oxidizing bacteria; most of them were associated with bacteria from the *Pseudomonas* genera, confirming the difficulties associated to cultivating these organisms on synthetic media. For the denitrifying functional group, obtained by culture methods, the identification using the *nosZ*, 16S rDNA and *nirS* molecular markers revealed that they were related to bacteria from the *Pseudomonas* and *Ralstonia* genera.

INTRODUCCION

El nitrógeno es un componente esencial de los aminoácidos, los ácidos nucleicos, los aminoazúcares y de sus polímeros. Su valencia estable es de -3 en el amoníaco (NH_3) y $+5$ en el nitrato (NO_3^-) e involucra una gran variedad de reacciones de oxido-reducción asociadas generalmente con sistemas de transporte de electrones (Ferguson, 1998). La atmósfera es el principal reservorio de este elemento, donde constituye el 79% de los gases. Sin embargo, por su incorporación lenta y difícil a la biósfera, la disponibilidad de nitrógeno combinado es un factor limitante para la producción primaria en muchos ecosistemas (Atlas y Bartha, 2001).

El ciclo del nitrógeno consiste en una serie de reducciones y oxidaciones sucesivas, que conducen a la transformación del nitrógeno en formas accesibles al metabolismo de los animales, las plantas y los microorganismos. De esta manera el nitrógeno circula de forma cíclica a través del suelo y de la atmósfera. Teniendo en cuenta que el dinitrógeno (N_2) elemental gaseoso en la atmósfera es el mayor reservorio de este elemento, podríamos comenzar el estudio del ciclo biogeoquímico (Figura 1) con la **fijación**, proceso que permite la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+). Las etapas posteriores en la conversión del nitrógeno involucran la oxidación del amonio a nitrato (NO_3^-) o **nitrificación**, y el retorno final del nitrógeno a su estado elemental en un proceso llamado **desnitrificación** o respiración del nitrato (Atlas y Bartha, 2001). Estos procesos en su conjunto constituyen una visión simplificada del ciclo de este elemento y a continuación se explican de una manera más detallada.

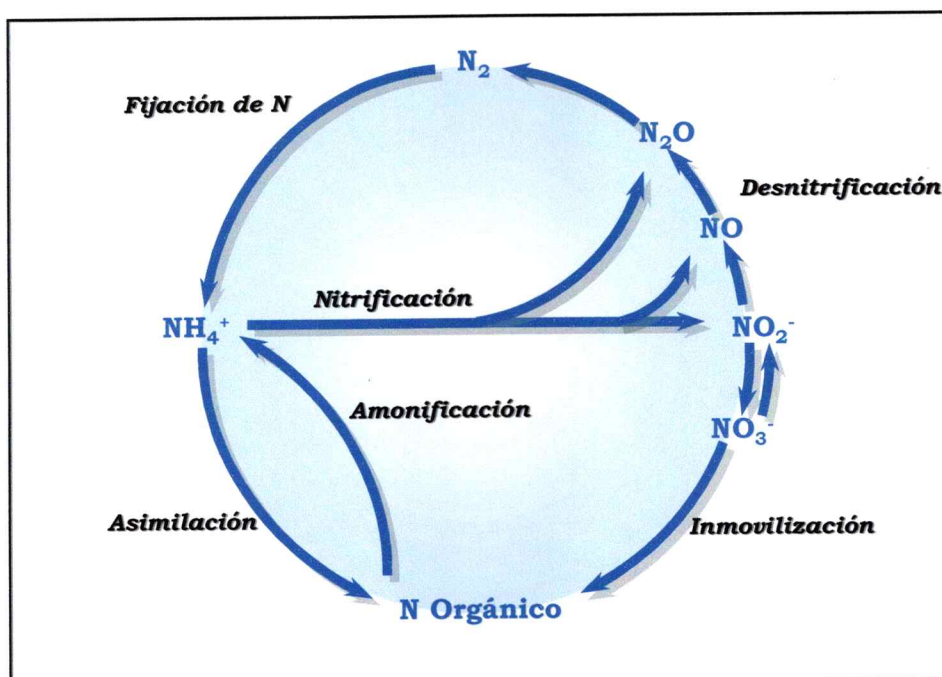


Figura 1. Visión general del ciclo del nitrógeno. Se presentan las principales etapas del ciclo biogeoquímico de este elemento, así como sus formas químicas.

- **Fijación biológica del nitrógeno**

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) corresponde a la reducción del nitrógeno molecular (N_2) a amonio biológicamente disponible (NH_4^+) y es catalizada por la enzima nitrogenasa, la cual se encuentra codificada en el operón *nifHDK* de los microorganismos que la poseen.

La FBN es llevada a cabo por grupos de procariontes filogenéticamente diversos, pertenecientes a los dominios Archaea y Bacteria. Estas últimas pertenecen a diversos géneros de vida libre, entre las cuales se encuentran las bacterias asociadas a la rizósfera y las bacterias simbióticas que forman asociaciones mutualistas con plantas y hongos (Young, 1992). Algunas estimaciones indican que la simbiosis entre las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) y las plantas contribuye con casi la mitad de la fijación biológica del nitrógeno anual en los ecosistemas terrestres, teniendo así el mayor impacto cuantitativo en el ciclo del nitrógeno (Hussein, 1999).

Entre las bacterias fijadoras de vida libre pueden encontrarse: anaeróbicas obligadas o facultativas (e.j. *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp., *Desulfovibrio* sp.), aeróbicas obligadas (e.j. *Azotobacter* spp., *Azospirillum* sp.) y fotosintéticas (bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas, y bacterias verdes sulfurosas) (Allan y Graham, 2002). Entre las bacterias que fijan nitrógeno en simbiosis con las leguminosas destacan aquéllas que pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*. Además, algunos actinomicetes también pueden fijar el nitrógeno atmosférico tanto en vida libre como en asociación simbiótica con determinadas plantas. Un ejemplo lo constituyen las actinobacterias del género *Frankia*, que cuando viven en asociación con ciertas plantas induce en sus raíces la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. La asociación entre la actinobacteria *Frankia* y las raíces de las plantas se conoce como simbiosis actinorrícica (Benson y Silvester, 1993). Ecológicamente, las plantas actinorrícicas son usualmente pioneras en suelos pobres en nitrógeno y se encuentran frecuentemente en sitios relativamente inhóspitos (Shwencke y Carú, 2001).

- **Nitrificación**

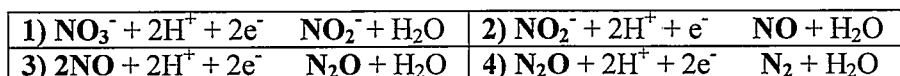
La nitrificación es el proceso aeróbico mediante el cual el amonio (NH_4^+) es transformado a nitrato (NO_3^-) utilizando nitrito (NO_2^-) como intermediario. Este proceso ocurre en dos etapas y es realizado por dos tipos diferentes de organismos distinguibles por el sustrato que utilizan: la oxidación del amonio a nitrito es llevada a cabo por las bacterias oxidadoras de amonio (BOA) y es catalizada por la enzima amonio monooxigenasa codificada en el gen *amoA*, mientras que la oxidación del nitrito a nitrato es realizada por las bacterias oxidadoras de nitrito (BON) y es catalizada por la enzima nitrito oxidasa (Kowalchuk y Stephen, 2001).

Metabólicamente, las BOA tienen en común la habilidad de utilizar el amonio como única fuente de energía y fijar dióxido de carbono (CO₂). Las BOA son organismos quimiolitotróficos y aerobios obligados, aunque algunas especies puedan ser altamente tolerantes a las bajas concentraciones de oxígeno o a los ambientes anóxicos. Las BOA se encuentran en la mayoría de los ambientes donde el amonio está disponible a través de la mineralización de la materia orgánica o de fuentes de nitrógeno antropogénicas tales como fertilizantes y desechos; siendo generalmente ubicuas en suelos, aguas dulces y ambientes marinos (Kowalchuk y Stephen, 2001).

Las BOA actualmente conocidas comprenden dos grupos monofiléticos basados en la comparación de las secuencias del 16S rDNA a partir de cepas cultivadas. Uno de estos comprende cepas de *Nitrosococcus oceanus*, dentro de la subdivisión gamma (γ) de las Proteobacterias y el otro grupo se encuentra dentro de la subdivisión beta (β) de las Proteobacterias y comprende los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*. Basados en la similitud de secuencia del rDNA 16S, los géneros *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio* se incluyeron finalmente dentro del género *Nitrosospira* (Head y col., 1993).

- **Desnitrificación**

Se define como desnitrificación a la reducción del nitrato (NO₃⁻) a gas nitrógeno (N₂) vía nitrito (NO₂⁻), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N₂O) (Knowles, 1982) según las siguientes reacciones:



Las oxidoreductasas que secuencialmente reducen el nitrato a N₂ son: la nitrato reductasa (codificada por los genes *narG* o *napA*), la nitrito reductasa

(codificada por *nirK* o *nirS*), la óxido nítrico reductasa (codificada por *norB* o *norZ*) y la óxido nitroso reductasa (codificada por el gen *nosZ*) (Zumft, 1997).

Muchas de las bacterias reductoras de nitrato no poseen todas las enzimas desnitrificantes. Algunas realizan sólo pasos únicos; otras reducen nitrato a óxido nitroso pero no poseen la óxido nitroso reductasa (Wood y col., 2001).

La desnitrificación es llevada a cabo por las bacterias, en su mayoría heterotróficas, que preferentemente crecen en ambientes aeróbicos pero que tienen una capacidad alternativa para usar los óxidos de nitrógeno como aceptores respiratorios de los electrones cuando el oxígeno se vuelve escaso. Condiciones de oxígeno limitantes (10 nM O₂) son usualmente necesarias para que ocurra desnitrificación (Tiedje, 1988). La capacidad de desnitrificación entre los procariotas no sigue ningún patrón distintivo. La reacción es realizada por una diversidad de bacterias taxonómicamente diferentes, distribuidas en aproximadamente 50 géneros pertenecientes a las distintas subclases de las Proteobacterias. Entre los géneros más conocidos se encuentra *Pseudomonas* (γ proteobacteria) el cual contribuye con un considerable número de bacterias desnitrificantes (Zumft, 1997), siendo generalmente considerado como el grupo bacteriano predominante en el proceso de la desnitrificación (Janda y col., 1998).

- **El ciclo del Nitrógeno ¿Por qué estudiarlo?**

En los últimos años, el estudio de los microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno ha cobrado gran importancia a nivel biológico, ecológico y biotecnológico.

En el caso de los microorganismos diazotróficos del suelo, parte del nitrógeno fijado e incorporado a la rizósfera queda disponible para las plantas. (Atlas y Bartha, 2001). Así, la aplicación de las técnicas convencionales y de la

biotecnología pueden optimizar la interacción planta – bacteria para favorecer la fijación biológica del nitrógeno, mejorando la fertilidad y la productividad de los suelos pobres que permitan reemplazar el uso de los fertilizantes químicos (Mogabe, 1994; Baldani y col., 1997).

Por su parte, los oxidadores de amonio y de nitrito mediante la oxidación biológica de los compuestos reducidos de nitrógeno, conducen generalmente a la remoción del nitrógeno del ambiente mediante la producción de formas móviles del mismo (Voytek y Ward, 1995; Bruns y col., 1999). La remoción del nitrógeno a partir del tratamiento de los desechos es de extrema importancia ambiental, ya que la liberación de los desechos no tratados puede resultar en una eutrofización del ambiente. Esto hace del tratamiento de los desechos una importante aplicación biotecnológica de las BOA (Kowalchuk y Stephen, 2001).

El interés en la desnitrificación existe por diversas razones. Primero, es el principal mecanismo de pérdida de los fertilizantes nitrogenados, disminuyendo la eficiencia de estos y aumentando la contaminación de las aguas subterráneas con nitrato (Ollinger y col., 1993). Segundo, es el mecanismo mediante el cual el ciclo global del nitrógeno es balanceado (Knowles, 1982). Tercero, el óxido nitroso (N_2O) generado durante la reducción del nitrato, ha mostrado ser un importante gas de efecto invernadero contribuyendo hasta en un 6% con el calentamiento global y participando en la disminución de la capa de ozono a través de la producción estratosférica de NO (*Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC). Diversas investigaciones han destacado el papel de la composición de la comunidad desnitrificante entre los factores que conducen a las emisiones de N_2O (Holtan-Hartwig y col., 2000; Cavigelli y col., 2001).

- **Técnicas de estudio: métodos dependientes e independientes de cultivo**

Para el estudio de estos grupos bacterianos, las metodologías actuales se encuentran enfocadas en la descripción de su diversidad en los suelos. Entre ellas existen técnicas dependientes de cultivo, basadas en el aislamiento y el crecimiento de los microorganismos a partir de muestras ambientales (Stevenson y col., 2004; Heylen y col., 2006), y técnicas moleculares independientes de cultivo a través del estudio de marcadores moleculares. Estas últimas incluyen el clonamiento dependiente de PCR (Kirshtein y col., 1991; Nold y col., 2000) y técnicas de *fingerprinting* como son la electroforesis en geles denaturantes o DGGE (Kowalchuk y Stephen, 1997; Bruns y col., 1999) y los polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción o RFLP asociado a PCR (Widmer y col., 1999; Stres y col., 2004), entre otras.

En algunos casos, como el de los diazótrofos, las aproximaciones moleculares entregan una visión más completa de la comunidad que los estudios basados en el cultivo (Poly y col., 2001). Entre los genes que codifican para el complejo de la nitrogenasa, el *nifH* ha sido el marcador molecular más utilizado para estimar la diversidad de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Poly y col., 2001, Rösch y col. 2002, Yeager y col. 2005). Esto se debe a que el *nifH* es un gen conservado (Rosado y col., 1997) y la filogenia inferida a partir de él concuerda con la filogenia del rRNA 16S (Zehr y col., 2003).

Por su parte, la investigación sobre la nitrificación autotrófica en los sistemas naturales también ha sido limitada por las dificultades en el aislamiento y el cultivo de los microorganismos oxidadores de amonio (Stephen y col., 1996), debido a las bajas tasas de crecimiento, los bajos rendimientos de biomasa y el limitado número de caracteres fenotípicos distintivos (Prosser, 1989). Por este

motivo, se ha hecho necesario el desarrollo de diversas técnicas independientes de cultivo. La naturaleza monofilética de las BOA del subgrupo de las β -proteobacterias ha facilitado el diseño de partidores de PCR y sondas de oligonucleótidos que tienen como blanco el gen 16S rDNA en este grupo (McCaig y col., 1994; Voytek y Ward, 1995). La clonación y secuenciación de estos genes han sido extensivamente aplicadas para crear inventarios filogenéticos de los variados ambientes (Purkhold y col., 2000). Otros estudios han utilizado el análisis de los genes funcionales de los oxidadores de amonio, en particular el gen *amoA*, el cual se encuentra presente en todos aquellos microorganismos capaces de utilizar el amonio como fuente de energía (Sinigalliano y col., 1995; Rothawe y col., 1997) y cuya topología, al igual que la del gen *nifH*, es congruente con la de aquellos árboles realizados a partir de las secuencias del gen 16S rDNA (Purkhold y col., 2000).

En el caso de las bacterias desnitrificantes, a diferencia de las anteriores, los estudios mediante las técnicas dependientes de cultivo sí han sido exitosos. Esto debido a la facilidad con la que estos microorganismos pueden ser aislados y cultivados desde diferentes sustratos (Chéneby y col., 2000; Lim y col., 2005; Heylen y col., 2006). Paralelamente se han utilizado las técnicas moleculares independientes de cultivo, basadas en la utilización de los genes de las diferentes enzimas reductasas (genes *nor*, *nir*, *nos*) como marcadores moleculares para los análisis en los diversos ambientes, incluyendo el suelo (Braker y col., 1998 y 2000; Rosch y col., 2002; Stres y col., 2004).

Aunque las técnicas moleculares permiten aproximarse al conocimiento de la diversidad de los ensamblajes microbianos, esto no disminuye la necesidad de continuos esfuerzos y nuevas técnicas en el cultivo de éstos. Ambos enfoques

pueden ser altamente complementarios en varias maneras (Liesack y col., 1997):

(a) Los cultivos puros son los mejores recursos para obtener información de las secuencias que podría ayudar en la comparación de árboles filogenéticos basados en las secuencias del 16S rDNA y en marcadores codificadores de las proteínas tales como los genes funcionales. (b) Los estudios moleculares entregan información útil sobre la estructura genética de los ensamblajes microbianos “in situ” y entregan información útil para la búsqueda y obtención de nuevos aislados. (c) Las estrategias moleculares aportan las mejores oportunidades para realizar un seguimiento de las poblaciones microbianas y sus actividades en análisis experimentales (Kowalchuk y Stephen, 2001; Furlong y col., 2002). Además, los datos de secuencias a medida que se encuentren disponibles, pueden ser utilizados para diseñar o refinar las sondas para su uso en los estudios orientados a la estimación de la abundancia relativa de los tipos de secuencias en las muestras naturales (Stephen y col., 1996).

En esta memoria se abordó el estudio de la composición de los principales grupos bacterianos que participan en el ciclo del nitrógeno del matorral semiárido. A la fecha hay escasa información sobre la composición de los ensamblajes microbianos en estos suelos. Para ello se utilizó como sistema de estudio los grupos microbianos asociados a la rizósfera de la planta actinorríca *Colletia hystrix*. El nitrógeno fijado a través de la simbiosis entre *C. hystrix* y la actinobacteria *Frankia* es una fuente importante de ingreso de nitrógeno al suelo en forma de amonio (Silvester y col., 1985). Por lo tanto se espera que esta rizósfera actinorríca sea un microhabitat donde se produzcan las principales transformaciones de este nutriente y por lo tanto sea sistema adecuado para estudiar los distintos grupos funcionales del ciclo biogeoquímico en estos suelos.

Considerando estos antecedentes, el objetivo general de este trabajo fue determinar la composición de los gremios bacterianos de fijadores de nitrógeno, oxidadores de amonio y desnitrificadores del suelo semiárido del matorral esclerófilo de Chile Central, específicamente los gremios bacterianos asociados a la rizósfera de la planta actinorríca *Colletia hystrix* y a suelo sin cobertura vegetal adyacente, utilizando para ello métodos dependientes e independientes de cultivo.

Con este propósito nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- i) Determinar la composición de las bacterias fijadoras de nitrógeno mediante la clonación y secuenciación del marcador molecular *nifH*.
- ii) Determinar la composición de las bacterias oxidadoras de amonio mediante la clonación y secuenciación del marcador molecular rDNA 16S específico para β proteobacterias y la composición de la fracción cultivable, mediante la amplificación y secuenciación del mismo gen.
- iii) Determinar la composición de las bacterias desnitrificantes mediante la clonación y secuenciación del marcador molecular *nosZ* y la composición de la fracción cultivable mediante la amplificación y secuenciación de los marcadores moleculares *nosZ*, *nirS* y rDNA 16S.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Localidad y colecta de las muestras

El sitio de estudio se ubica en la localidad de “El Romeral” ($33^{\circ}48'S$, $70^{\circ}14'W$), en el sector del Cajón del Maipo, Región Metropolitana (Figura 2). El sitio de estudio corresponde a una zona semiárida del matorral esclerófilo de Chile Central definido por una población de *Colletia hystrix*. Las muestras están distribuidas en una área de aproximadamente 10×10 m, fueron tomadas a 10 cm de profundidad, homogenizadas y almacenadas a $4^{\circ}C$ hasta su utilización.



Figura 2. Ubicación geográfica del sitio de muestreo. El recuadro rojo indica la ubicación de “El Romeral”.

2. Medios de cultivo y aislamiento de las bacterias

2.1. Bacterias Desnitrificantes (BDN)

Para el aislamiento y cultivo de bacterias desnitrificantes se utilizó el medio completo DNB (*Denitrifying Nitrate Broth*), compuesto por *Nutrient Broth* (NB) (Difco®) como fuente de carbono, KNO_3 0,8% como fuente de nitrato, micronutrientes 0,15% y buffer fosfato 0,005 M.

El protocolo seguido para aislar los microorganismos fue el siguiente: se mezcló un 1 g de muestra de suelo con 10 ml de agua estéril y se agitó durante 1 h, la suspensión se dejó decantar y se hicieron diluciones seriadas a partir del sobrenadante en tubos con medio DNB. Posteriormente, 100 μ l de la dilución deseada se colocaron en un tubo de vidrio con 3 ml de medio DNB/agar blando (0,7%) a una temperatura de 40°C. El tubo se agitó suavemente y se vació el contenido en una placa de Petri con medio DNB/agar sólido (2%). Se dejó solidificar el agar blando con la muestra y se incubó a 27°C hasta que se observó la presencia de colonias (aproximadamente 3 días).

Las colonias aisladas se tomaron cuidadosamente con un asa estéril e inocularon en tubos con medio DNB y con una campana de Durham. La presencia de gas en las campanas indicaría la presencia de posibles microorganismos desnitrificadores. A partir de estas muestras se prepararon cultivos líquidos en medio DNB para su posterior análisis.

2.2. Bacterias Oxidadoras de Amonio (BOA)

Para el aislamiento de bacterias oxidadoras de amonio se utilizó el medio de cultivo BOA, descrito previamente por Shinner y col, (1996). El protocolo de cultivo fue el siguiente: se mezcló 1 g de suelo con 20 ml de medio de cultivo BOA durante 1 semana y a una temperatura de 27°C. Luego la suspensión se dejó decantar y se pasaron los 5 ml superiores a 20 ml de medio fresco. Nuevamente se incubó durante una semana a 27°C con agitación. Finalmente se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon 50 y 100 μ l de la dilución deseada. Las placas fueron incubadas a 27°C hasta la aparición de colonias. Una vez que se observaron colonias, éstas se tomaron de manera independiente con un asa estéril y se volvieron a incubar en medio líquido

como se indicó anteriormente. Luego se realizaron diluciones seriadas y la dilución 10^{-4} se plaqueó e incubó nuevamente hasta la aparición de colonias. Estos pasos fueron repetidos hasta la obtención de colonias aisladas, lo cual fue revisado a simple vista y bajo microscopio.

3. Extracción del DNA

3.1. Obtención del DNA a partir de los cultivos

Para el análisis de desnitrificadores, 100 μ l de cada muestra positiva para la producción de gas en la campana de Durham se centrifugaron a una velocidad de 13.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 10 μ l de buffer TE (10 μ M Tris-HCl y 1 μ M de EDTA) para proceder a la lisis, mediante un ciclo térmico. El programa de lisis fue de 8 ciclos que variaban entre 98°C y 4°C durante 1 min cada uno.

Para la extracción de DNA a partir de los potenciales oxidadores de amonio, no se utilizaron cultivos líquidos debido a que éstos no presentaron una densidad celular suficiente para el análisis. En su lugar se utilizaron las colonias aisladas y crecidas en medio sólido. Para ello, parte de las colonias de interés se resuspendieron con un mondadientes estéril en 10 μ l de buffer TE. Estas muestras se sometieron a un proceso de lisis por choque térmico que consistió en 5 ciclos a 100°C por 5 min y -20°C durante 10 min.

3.2. Obtención del DNA a partir de las muestras de suelo

El DNA de las muestras de suelo y rizósfera se obtuvo a partir de 25 mg de suelo empleando el kit de extracción "Ultraclean Soil DNA" (MoBio Laboratorios, Inc.). El DNA obtenido se resuspendió en un volumen final de 50 μ l de buffer TE y se guardó a -20°C.

Para la identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante la amplificación por PCR del gen *nifH*, se seleccionaron muestras de rizósfera y suelo, las cuales no recibieron ningún tratamiento previo. Para las muestras utilizadas en la identificación de bacterias desnitrificadoras y oxidadoras de amonio, las muestras de suelo y rizósfera se enriquecieron previamente durante toda la noche con caldo nutritivo (*Nutrient Broth*) diluido (0.1X). Posteriormente la muestra se centrifugó eliminándose el sobrenadante y la extracción se realizó a partir del *pellet* utilizando el Kit de extracción de DNA según las indicaciones del proveedor.

La calidad y concentración del DNA total se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio 0,5 ug ml⁻¹ (Sigma) comparándolo con cantidades conocidas del marcador de peso molecular λ HindIII (Gibco BRL®).

4. Amplificaciones por PCR

4.1. Amplificación del gen funcional *nifH*

El gen *nifH* se amplificó mediante un PCR semianidado utilizando los partidores *nifHF* y *nifHR* (Rösch y col., 2002) para la primera reacción, y *nifHF* junto con *PolR* (Poly y col., 2001) para la segunda reacción (Tabla 1).

La reacción de PCR para ambas etapas se realizó en un volumen final de 25 µl con 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 1 mg ml⁻¹ de BSA (Gibco-BRL®), 200 µM de cada dNTP, 0,12 µM de cada partidor, formamida desionizada al 1% y 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen®) en buffer de PCR 1X (Invitrogen®).

Los ciclos térmicos de la primera etapa fueron como sigue: una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguida de 1 ciclo de desnaturalización a

94°C por 20 s, hibridización a 65°C por 30 s y elongación a 72°C por 30 s; 2 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 s, hibridización a 62°C por 30 s, y elongación a 72°C por 35 s; 3 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 s, hibridización a 59°C por 30 s y elongación a 72°C por 40 s; 4 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 s, hibridización a 56°C por 30 s, y elongación a 72°C por 50 s; 5 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 s, hibridización a 53°C por 30 s y elongación a 72°C por 50 s; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 s, hibridización a 50°C por 45 s y elongación a 72°C por 60 s; y una extensión final a 72°C por 10 min.

En la segunda etapa del PCR los ciclos térmicos consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 20 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridización de 65°C por 45 s y elongación a 72°C por 1 min 30 s; 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridización a 55°C por 45 s y elongación a 72°C por 1 min 30 s. Finalmente una elongación a 72°C durante 5 min. El tamaño del fragmento obtenido coincidió con el fragmento esperado de 442 pb.

Tabla 1. Partidores utilizados en este estudio

Gen	Partidor	Secuencia* (5'→3')	Posición en el genoma	Referencia
<i>nifH</i>	nifHF	AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC	34-59	Rösch y col., 2002
<i>nifH</i>	nifHR	TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT	466-491	Rösch y col., 2002
<i>nifH</i>	PolR	ATS GCC ATC ATY TCR CCG GAC	457- 478	Poly y col., 2001
<i>nosZ</i>	nosZ-F	CGY TGT TCM TCG ACA GCC AG	1211-1230	Rösch y col., 2002
<i>nosZ</i>	nosZ-R	CAT GTG CAG NGC RTG GCA GAA	1897-1917	Rösch y col., 2002
<i>nirS</i>	cd3af	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	916- 935	Michotey y col., 2000
<i>nirS</i>	R3cd	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A	1322- 1341	Throbäck y col., 2004
16S rDNA	fd1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8-26	Weisburg y col., 1991
16S rDNA	rP2	TGC CGA TGG AAC AAT GCT GAA	1494- 1513	Weisburg y col., 1991
16S rDNA	β-AMOf	TGG GGR ATA ACG CAY CGA AAG	141- 161	McCaig y col., 1994
16S rDNA	β-AMOr	AGA CTC CGA TCC GGA CTA CG	1301- 1320	McCaig y col., 1994
16S rDNA	NitA	CTT AAG TGG GGA ATA ACG CAT CG	137- 159	Voytek y Ward, 1995
16S rDNA	NitB	TTA CGT GTG AAG CCC TAC CCA	1214 - 1234	Voytek y Ward, 1995
Vector	M13f	GTA AAA CGA CGG CCA G	-	-
Vector	M13r	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	-	-

* B= C, G ó T; R= A ó G; S= C ó G; V= A, C ó G; Y= C ó T.

4.2. Amplificación del gen ribosomal 16S (rDNA 16S)

Para amplificar el DNA ribosomal 16S se utilizaron los partidores universales fD1 y rP2 (Weisburg y col., 1991). La secuencia de los partidores se especifica en la Tabla En cada reacción, la mezcla de PCR contenía 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen[®]), 0,12 mg ml⁻¹ de BSA (Gibco-BRL[®]), 120 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada partidor y 2,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen[®]) en buffer de PCR 1X (Invitrogen[®]), dando como resultado un volumen de 24 μl al cual se le agregó 1 μl del DNA templado.

El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguida de 30 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min, hibridización a 57°C por 30 s y elongación a 72°C por 2 min. La amplificación terminó con una extensión final de 7 min a 72°C. El fragmento obtenido fue de 1500 pb de acuerdo al fragmento esperado del DNA ribosomal 16S.

4.3. Amplificación del gen ribosomal 16S específico para β proteobacterias

Se utilizaron los partidores β-AMOf y β-AMOr (McCaig y col., 1994) y NitA y NitB (Voytek y Ward, 1995) para la amplificación específica del 16S rDNA de las bacterias oxidadoras de amonio. Estos partidores se utilizaron en un PCR anidado empleando como templado el producto de la amplificación del mismo gen con los partidores universales fD1 y rP2 (Tabla 1).

La mezcla para la reacción de PCR es la misma ya mencionada en el PCR para el gen 16S rDNA.

El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 s, hibridización a 57°C por 45 s y extensión a 72°C por 1 min 30 s. El

programa finaliza con una extensión a 72°C durante 20 min. El tamaño del fragmento amplificado fue determinado por electroforesis en gel de agarosa y coincidió con el fragmento esperado de 1,179 kb para los partidores β amo y de 1,097 kb para los partidores Nit.

4.4. Amplificación del gen funcional *nosZ*

El gen *nosZ* se amplificó utilizando los partidores nosZ-F y nosZ-R (Tabla 1) (Rösch y col., 2002). Tanto la mezcla como el programa del PCR son idénticos a los ya descritos para el gen *nifH*. El tamaño esperado del fragmento es de 700 pb.

4.5. Amplificación del gen funcional *nirS*

La amplificación del gen *nirS* se llevó a cabo utilizando como templado los mismos cultivos usados en la amplificación del gen *nosZ*. Los partidores utilizados fueron cd3af (Michotey y col., 2000) y R3cd (Throbäck y col., 2004) (Tabla 1). La mezcla de PCR contenía master mix 1X (GoTaq DNA Master Mix) y 0,4 μ M de cada partidador, dando un volumen final de 24 μ l por cada muestra, a la cual se le agregó 1 μ l del DNA templado.

Para la amplificación del gen *nirS* se utilizó el programa descrito previamente por Throbäck y col. (2004) con algunas modificaciones. Este constó de una desnaturalización inicial del DNA a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 57 °C y extensión 1 min a 72°C. El programa finaliza con una extensión final de 7 min a 72°C. El fragmento esperado es de 425 pb.

Los productos de PCR obtenidos se limpiaron con el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) para eliminar el colorante verde presente en el GoTaq DNA Master Mix.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Instruments[®], Norwalk, Conn), para la amplificación de *nifH*. Las otras reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador PTC- 150 Minicycler (MJ Research, Inc).

En todas las reacciones de PCR realizadas, cinco microlitros (5 μ l) de los productos de la amplificación se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en buffer TAE 1X mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 μ g ml⁻¹) (Sigma[®]). Para determinar el tamaño de los amplificados se utilizó el marcador de peso molecular 100 bp ladder (Gibco BRL[®]).

5. Purificación de los productos de PCR

Para optimizar el rendimiento de la clonación, los productos de PCR se purificaron con el kit "Ultraclean PCR clean up" (MoBio Laboratorios, Inc.), obteniéndose un volumen final de 50 μ l de DNA. Para concentrarlo se agregaron 2 μ l de NaCl 5 M, 100 μ l de etanol absoluto frío y se dejó precipitando durante 4 hs a -20°C. Una vez precipitada, la muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min, después de lo cual se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en un volumen final de 18 μ l con buffer TE.

6. Clonación y secuenciación de los amplificados

Los fragmentos amplificados se clonaron mediante el "Dual Promoter TA Cloning Kit pCRII Vector" (Invitrogen[®]) en el caso del gen *nifH*, mientras que para el gen 16S rDNA se utilizó el "InsTAclone[™] PCR Cloning Kit" (Fermentas[®]) según instrucciones de los fabricantes. Los transformantes se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) y se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (50 μ g ml⁻¹) y por su incapacidad de hidrolizar el compuesto X-gal en presencia de IPTG. La presencia del

inserto esperado se corroboró por PCR usando los partidores M13f y M13r del vector (Tabla 1). Para obtener el DNA de las colonias se tomó una porción de cada una con un mondadientes estéril y se resuspendió en 10 μ l de buffer TE. Las células suspendidas en TE se lisaron mediante 8 ciclos sucesivos de choques térmicos de 1 minuto a 98°C / 4°C. Un microlitro de la suspensión celular se usó como templado en la reacción de PCR que consistía en 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,12 mg ml⁻¹ de BSA (Gibco-BRL®), 200 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de cada partidor y 1,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen®) en buffer de PCR 1X (Invitrogen®) para un volumen final de 25 μ l. El programa térmico fue como sigue: una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min seguido de 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 s, hibridización a 56°C por 45 s y extensión a 72°C por 1 min 30 s. Finalmente el programa terminó con una extensión a 72°C durante 10 min.

La secuencia de los clones se obtuvo mediante secuenciación automática por Macrogen, Inc.

7. Perfiles de RFLP- PCR

Para definir los perfiles de RFLP, los productos de PCR se digirieron con 20 U de la enzima de restricción de corte frecuente *Hae*III (GG/CC) (Invitrogen®) por 4 h a una temperatura de 37°C seguida por una inactivación a 65°C durante 20 min. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8,0% en buffer TAE 1X y se reveló con nitrato de plata al 0,2%.

El protocolo de tinción con nitrato de plata consta de un primer paso de fijación de la muestra con etanol frío al 10% (v/v) por 5 min seguido por un tratamiento con ácido nítrico frío al 1% (v/v) durante 5 min. El gel se lavó con agua desionizada, luego se agregó la solución de nitrato de plata 0,2% (p/v) y se dejó en oscuridad por

20 min con agitación. El gel se lavó con agua desionizada por 1 min, luego se agregó la solución reveladora de carbonato de sodio 0,28 M, la cual se mantuvo hasta la aparición de bandas en el gel. Finalmente la reacción se detuvo agregando al gel ácido acético 10% (v/v) durante un tiempo de 5 min.

Los fragmentos de restricción se compararon con el marcador de peso molecular 50 bp ladder (Gibco BRL®).

8. Análisis de los datos

Los datos de las secuencias se compararon con aquéllas encontradas en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando para ello la herramienta bioinformática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Pearson y Lipman, 1988; Altschul y col., 1997). El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa Bioedit (*Bioedit Sequence Alignment Editor*, versión 7.0.5.2) (Hall, 1999).

Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el índice de distancia de Jukes y Cantor (Jukes y Cantor, 1969) mediante el método de *Neighbor-Joining* del programa Treecon (Van de Peer y De Watcher, 1994) con un *bootstrap* obtenido mediante 100 iteraciones.

RESULTADOS

1. Composición del gremio fijador de nitrógeno en el suelo y la rizósfera

1.1. Amplificación del gen *nifH* a partir de las muestras de suelo

Para amplificar un fragmento del gen *nifH* se realizó un PCR semianidado a partir del DNA extraído directamente de las muestras del suelo. La primera etapa de la amplificación se realizó con el partidor directo *nifH* F y el reverso *nifH* R y no entregó como resultado ninguna banda visible. La segunda etapa de amplificación se realizó con el mismo partidor directo y el partidor reverso Pol R. Esta amplificación entregó bandas de producto únicas y del tamaño esperado para el fragmento del gen *nifH*. Para los siguientes análisis se continuó trabajando con una muestra de suelo y una de rizósfera. En la figura 3 se muestra el fragmento amplificado de 442 pb del gen *nifH*. Los productos de la amplificación se purificaron y la concentración final fue de 3,4 ng μl^{-1} para la muestra de rizósfera y de 2,2 ng μl^{-1} para el suelo.

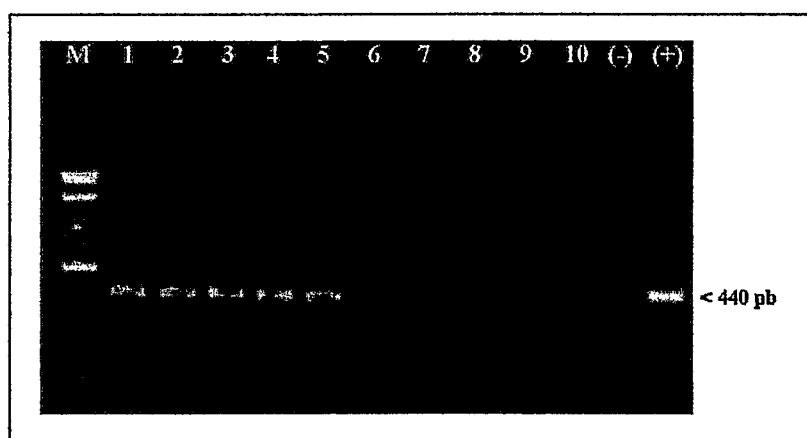


Figura 3. Productos de la amplificación para el gen *nifH*, visualizado en un gel de agarosa al 1.2%. M: marcador de peso molecular 100 bp. 1-5: muestras de la rizósfera; 6-10: muestras del suelo; (-): control negativo; (+): control positivo. La flecha muestra la banda del tamaño esperado (~440 pb.)

1.2. Clonación del gen *nifH*

Los productos de PCR obtenidos de ambas muestras se clonaron. La presencia del inserto de ~440 pb en los clones obtenidos se determinó mediante un PCR con los partidores específicos para el vector de clonación M13F y M13R seguido por una electroforesis en geles de agarosa. El tamaño del fragmento esperado era de 682 pb pues incluye el tamaño del amplicón *nifH* (442 pb) más los extremos del vector de clonación.

Para las muestras de la rizósfera y el suelo se obtuvieron y analizaron un total de 116 y 108 colonias, respectivamente. De las 116 colonias de la rizósfera, 105 (91%) dieron positivas para el inserto de interés. Para el suelo, en cambio, de las 108 colonias analizadas, sólo 60 (56%) dieron positivas (Tabla2).

Tabla 2. Resultado clonación gen *nifH*

Origen de las muestras	Clones analizados	Clones positivos para la amplificación del gen	% clones positivos
Rizósfera (C)	116	105	90,5%
Suelo (S)	108	60	55,5%

La Figura 4 muestra, a modo de ejemplo, la diferencia entre las colonias consideradas positivas y negativas tanto para los clones de la rizósfera (carriles 1-5) como para los clones del suelo (carriles 6-10). Como control positivo se utilizó un clon obtenido previamente para el mismo gen. De este modo, las bandas que coincidían con el tamaño del control (Figura 4, carril (+)) fueron tomadas como positivas, mientras que aquellas bandas que presentaban un tamaño diferente al del control (Figura 4, carriles 4 y 6) o más de una banda se consideraron como negativos y se descartaron.

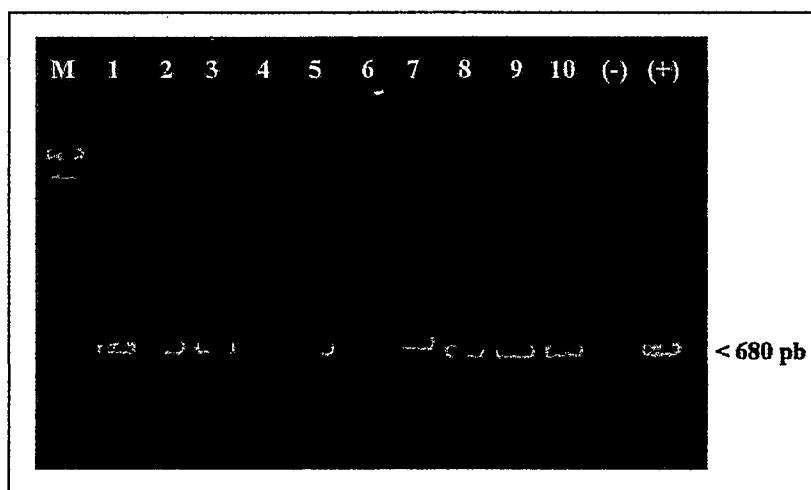


Figura 4. Resultado de la clonación del gen *nifH* evaluado según la amplificación con los partidores M13 y visualizado en gel de agarosa 1.2%.

M: marcador $\lambda/HindIII$; **1- 5:** muestras de la rizósfera; **6-10:** muestras del suelo; **(-):** control negativo; **(+)** control positivo. La flecha indica la banda del tamaño esperado de ~ 680 pb.

1.3. Determinación de la diversidad bacteriana mediante el ensayo de RFLP

El análisis por RFLP de los 105 clones positivos de la rizósfera reveló 36 perfiles de restricción o haplotipos diferentes. Para los clones derivados del suelo, en cambio, se encontraron 12 perfiles distintos entre los 60 clones positivos analizados. En ambas muestras, por separado, se obtuvieron perfiles similares o frecuentes. En el caso de la rizósfera, estos perfiles fueron los denominados A y B con un 14% y 17% de abundancia respectivamente, mientras que para el suelo los perfiles más frecuentes fueron L y M con un 40% y 32%, respectivamente (Tabla 3). Un 24% de los clones derivados de la rizósfera presentó un perfil único de restricción. En el suelo, en cambio, sólo un 8% de los clones presentó un perfil único. No se encontró ningún perfil compartido entre los clones derivados de la rizósfera y el suelo.

Tabla 3. Abundancia relativa de los diferentes haplotipos del gen *nifH* para las muestras de la rizósfera y el suelo

Haplotipo Rizósfera (n=105)	Abundancia relativa (%)	Haplotipo Suelo (n=60)	Abundancia relativa (%)
A	14,3	L	40,0
B	17,1	M	31,8
C	8,6	N	5,0
D	8,6	O	5,0
E	7,6	P	3,3
F	3,8	Q	3,3
G	3,8	R	3,3
H	3,8	Z**	8,3
I	3,8	Total	100,0
J	2,9		
K	1,9		
U**	23,8		
Total	100,0		

(*) La letra n corresponde al número total de los clones analizados

(**) Las letras U y Z agrupan aquellos clones de la rizósfera y el suelo, respectivamente, que presentaron perfiles de restricción únicos.

1.4. Determinación de la diversidad bacteriana mediante la secuenciación del gen *nifH*

Para la secuenciación del gen *nifH* se escogió un representante de cada perfil de restricción. Los clones se identificaron con una letra S para aquellos derivados del suelo y una letra C para aquellos derivados de la rizósfera de *C. hystrix*. Para el análisis filogenético, las secuencias de los clones se compararon con 28 secuencias de *nifH* obtenidas a partir de la base de datos (GenBank). Esto se realizó mediante la herramienta bioinformática BLAST y el programa de alineación de secuencias Bioedit. A partir del alineamiento de las secuencias, se construyó un árbol filogenético, el cual se presenta en la Figura 5.

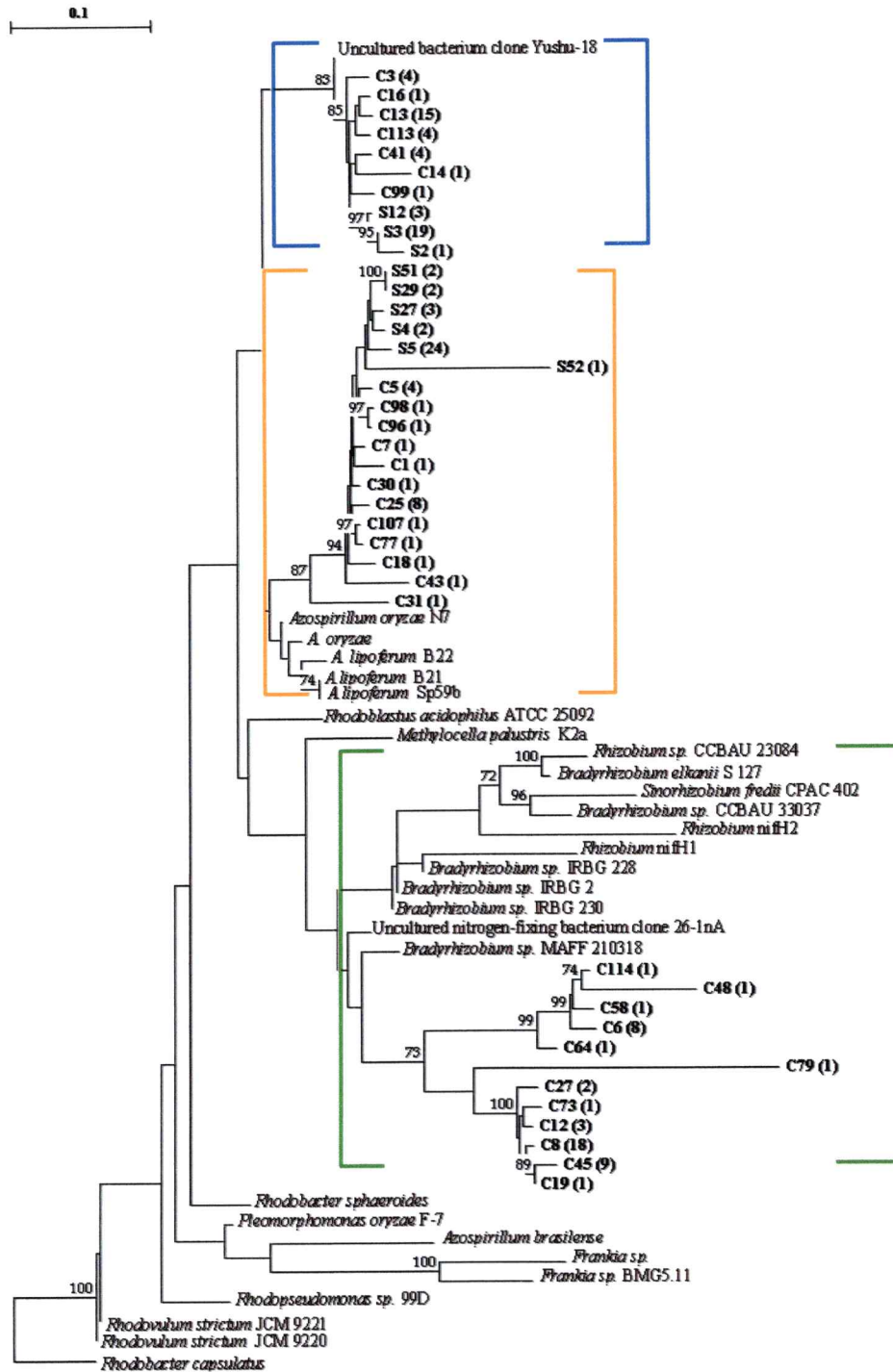


Figura 5. Árbol filogenético para el gen *nifH*. El árbol se construyó usando el índice de distancia de Jukes y Cantor y el método de agrupamiento de Neighbor-Joining. El *bootstrap* utilizado fue de 100 repeticiones y se muestran sólo los valores $\geq 70\%$. Los recuadros de color indican los principales grupos. El número entre paréntesis indica el número de clones con idéntico patrón de RFLP.

Podemos observar que las secuencias obtenidas se agrupan formando 3 ramas principales. La primera de ellas se encuentra asociada a clones ambientales para el gen *nifH* (recuadro azul, Figura 5). La segunda rama agrupa las secuencias relacionadas con las bacterias del género *Azospirillum* (recuadro amarillo, Figura 5), mientras que la tercera reúne las secuencias relacionadas con las bacterias del orden de los Rhizobiales pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* (recuadro verde, Figura 5).

2. Composición del gremio de oxidadores de amonio en el suelo y la rizósfera

2.1 Análisis de las bacterias oxidadoras de amonio mediante amplificación y clonación del gen ribosomal 16S rDNA de β proteobacterias a partir de muestras ambientales

El enriquecimiento de las muestras mediante el tratamiento con *Nutrient Broth* (NB) previo a la extracción del DNA genómico resultó en una amplificación del rDNA 16S más definida e intensa que las normalmente obtenidas en muestras sin tratamiento.

Luego de la extracción del DNA, se llevó a cabo la amplificación de las muestras mediante una estrategia de PCR anidado. Para la 1^o etapa del PCR las muestras fueron amplificadas con los partidores universales fD1 y rP2 para el gen 16S rDNA, obteniéndose un producto del tamaño esperado (1,5 kb). Para la 2^o etapa se probaron dos pares de partidores internos para este gen y específicos para β proteobacterias: β -AMOf con β -AMOr, y NitA con NitB. El producto de la amplificación fue, en ambos casos, del tamaño esperado de ~1,0 kb y se analizó indistintamente para ambos pares de partidores ya que el fragmento amplificado es coincidente en casi su totalidad. En la figura 6 A se observa un esquema de la amplificación y en 6 B uno de los geles obtenidos, a modo de ejemplo.

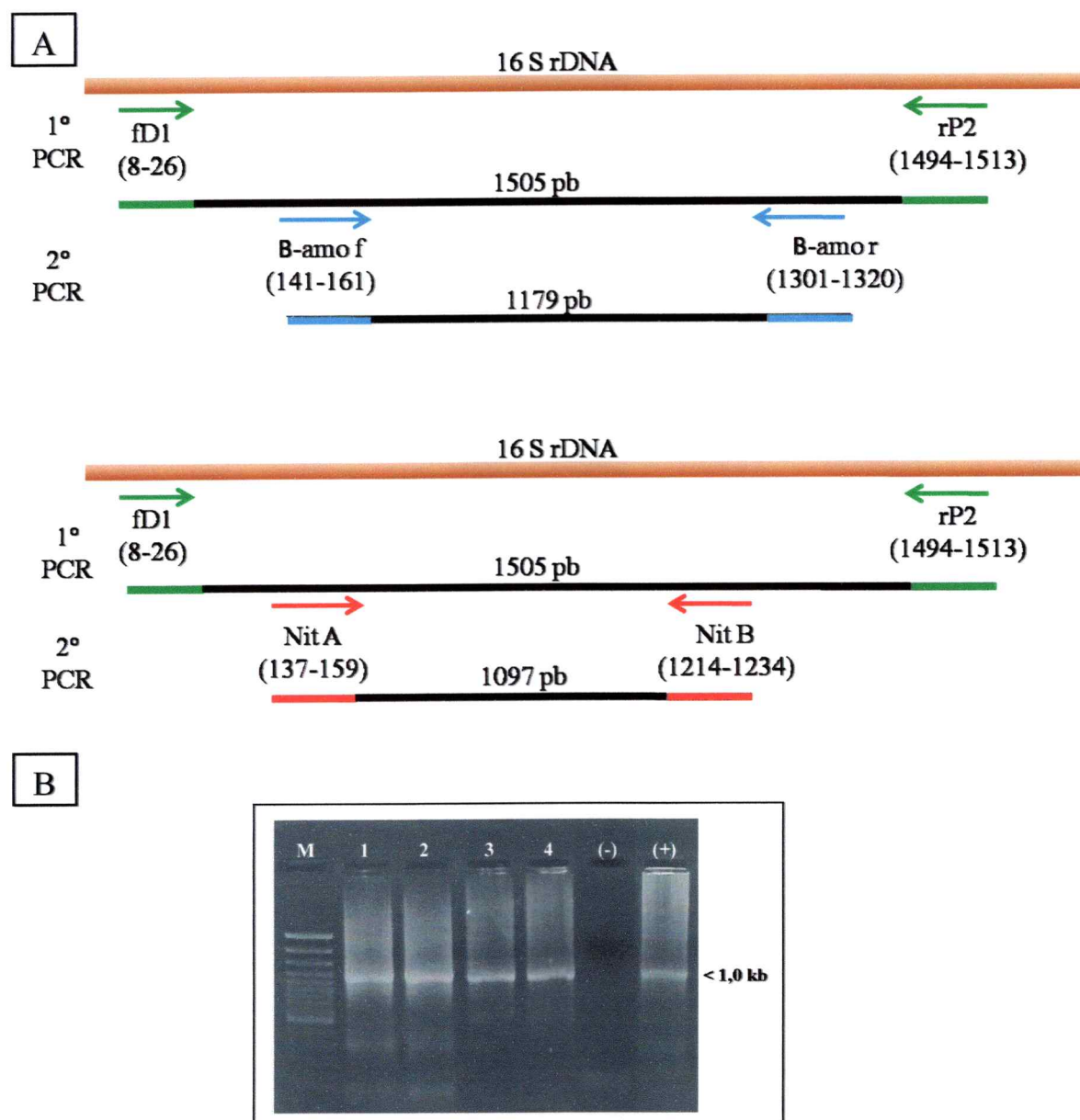


Figura 6. Amplificación del gen 16S rDNA específico para β proteobacterias.

(A) Esquema del PCR anidado. Las flechas corresponden a los partidores utilizados. Se indica la posición de cada partidor en el gen y el tamaño del fragmento amplificado en cada caso.

(B) Productos finales de la amplificación del resuelto por electroforesis en gel de agarosa al 1,2 %.

M: marcador de peso molecular 100 bp; 1-2: muestras de la rizósfera y el suelo amplificadas con partidores β AMO; 3-4: muestras de rizósfera y suelo amplificadas con partidores Nit; (-): control negativo; (+): control positivo. La flecha indica la banda del tamaño esperado (\sim 1,0 kb)

Los productos de la amplificación obtenidos se clonaron con el kit “InsTAcloneTM PCR Cloning” y posteriormente se revisó cada clon, para comprobar la presencia y tamaño del inserto, mediante una reacción de PCR con los partidores M13 específicos del vector de clonación usado. Para las muestras de la rizósfera se analizaron 66 clones de los cuales 29 clones fueron del tamaño esperado, mientras que para el suelo sin cobertura vegetal se analizaron 15 clones de los cuales 10 fueron del tamaño esperado (Tabla 4).

Tabla 4. Resultado de la clonación del gen 16S rDNA de β proteobacterias

Origen de las muestras	Clones analizados	Clones positivos para la amplificación del gen	% clones positivos
Rizósfera (C)	66	29	43,9 %
Suelo (S)	15	10	66,7 %

2.1.1. Caracterización de los clones mediante perfiles de RFLP de un fragmento del gen ribosomal 16S de las β -proteobacterias amplificado por PCR.

A partir de los clones positivos, se obtuvieron los amplicones respectivos, los cuales se digirieron con la enzima de restricción *Hae*III. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida para determinar su perfil de RFLP. En la figura 7 se presenta uno de estos geles.

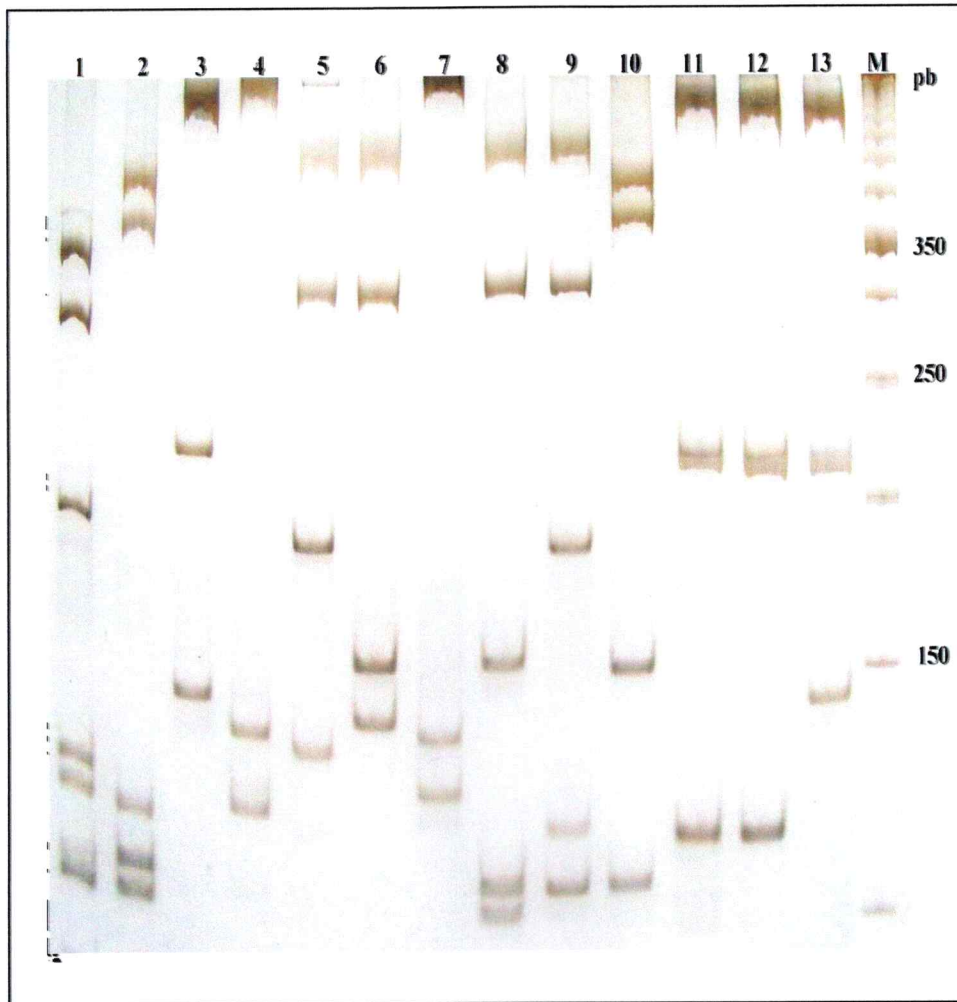


Figura 7. Patrones de RFLP de los clones de BOA determinados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Se observan los diferentes perfiles de restricción para cada uno de los cultivos. **M:** marcador de peso molecular 50 bp; **1-10:** clones de la rizósfera; **11-13:** clones del suelo sin cobertura vegetal.

El análisis por RFLP reveló la presencia de 27 perfiles de restricción diferentes en el caso de la rizósfera de *C. hystrix*, de los cuales 24 fueron únicos (perfiles U) y 3 se encontraron repetidos en al menos dos muestras (perfiles A, B, C). Por su parte, los clones derivados del suelo presentaron un total de 7 perfiles de restricción diferentes correspondientes a 3 perfiles únicos (perfiles Z) y 4 perfiles que se encontraron repetidos en más de una muestra (perfiles A, B, C, D).

En la tabla 5 se muestran las abundancias relativas de cada uno de estos haplotipos, tanto con respecto al total de clones de la rizósfera ($n=29$) como con respecto al total de clones del suelo ($n=10$).

Tabla 5. Abundancia relativa de los diferentes haplotipos del gen 16S rDNA de las β proteobacterias para las muestras de la rizósfera y el suelo.

RFLP Rizósfera ($n=29$)	Abundancia relativa (%)	RFLP Suelo ($n=10$)	Abundancia relativa (%)
A	3,44	A	20,0
B	3,44	B	10,0
C	6,89	C	20,0
U**	82,75	D	20,0
Total	100,0	Z**	30,0
		Total	100,0

(*) La letra n corresponde al número total de clones analizados

(**) Las letras U y Z agrupan aquellos clones de la rizósfera y el suelo, respectivamente, que presentaron perfiles de restricción únicos.

Se puede observar en la tabla 5 que las muestras de la rizósfera y el suelo compartieron entre ellas los perfiles de restricción A, B y C. Éstos alcanzaron una abundancia conjunta relativa de 7,7% 5,1% y 12,8% respectivamente con respecto al total de los clones analizados ($n=39$).

2.2 Análisis de las bacterias oxidadoras de amonio mediante aislamiento y cultivo

Además de la obtención y análisis de los clones a partir de las muestras de la rizósfera y el suelo, se intentó aislar y cultivar microorganismos oxidadores de amonio a partir de ambos sitios. Siguiendo el protocolo de cultivo y aislamiento de los microorganismos oxidadores de amonio ya descrito, se obtuvieron finalmente 10 colonias aisladas diferentes a partir de la rizósfera actinorrícica de *Colletia hystrix* y 13 colonias aisladas diferentes a partir del suelo sin cobertura vegetal, dando un total de 23 colonias aisladas. Éstas se sometieron a un proceso de lisis celular mediante choque térmico para su posterior análisis molecular por PCR.

2.2.1 Caracterización de las colonias aisladas mediante perfiles de RFLP de un fragmento del gen ribosomal 16S de las β -proteobacterias amplificado por PCR.

A partir de los aislados obtenidos se amplificó el gen ribosomal 16S. La 1ª etapa del PCR se realizó con los partidores universales fD1 y rP2 y resultó una banda única y del tamaño esperado (~1,5 kb) para todas las colonias aisladas. Para la segunda etapa del PCR se usaron los partidores internos β -AMOf y β -AMOr. De las 23 colonias analizadas 19 dieron una banda única y del tamaño esperado (~1.0 kb) y por lo tanto se consideraron como aislados positivos (Tabla 6).

Tabla 6.- Amplificación del gen 16S rDNA de las β proteobacterias a partir de los cultivos

Origen de las muestras	Colonias analizadas	Colonias positivas para la amplificación del gen	% colonias positivas
Rizósfera (C)	10	7	70%
Suelo (S)	13	12	92,3%

Los productos de PCR obtenidos se sometieron a una digestión con la enzima de restricción *HaeIII* para establecer su perfil de RFLP. El análisis de los polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción se visualizó en un gel de acrilamida al 8% teñido con nitrato de plata. En la figura 8 se muestran los perfiles de restricción de 16 de las 19 muestras positivas obtenidas.

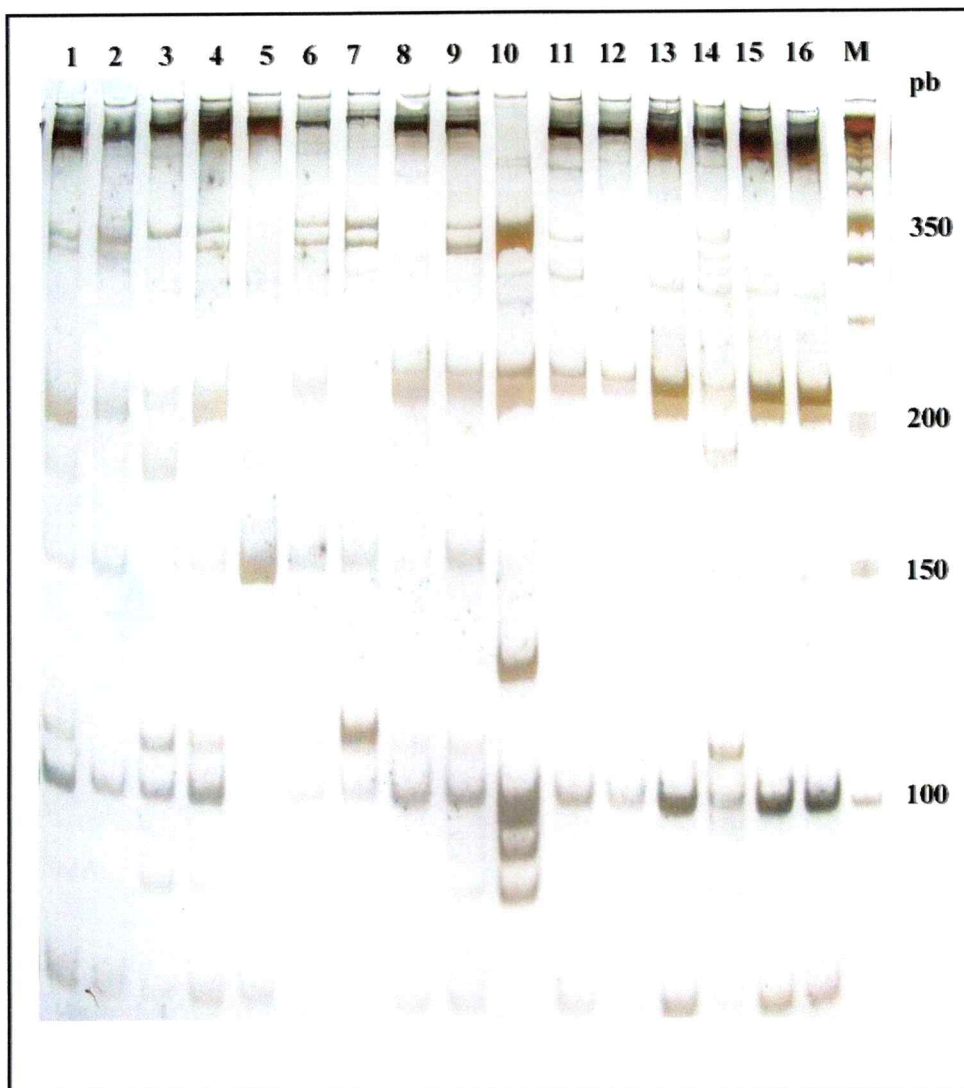


Figura 8. Patrones de RFLP de los cultivos de BOA determinados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Se observan los diferentes perfiles de restricción para cada uno de los cultivos. **M:** marcador de peso molecular 50 bp; **1-12:** aislados del suelo sin cobertura vegetal; **13-16:** aislados de la rizósfera.

El análisis por RFLP reveló la presencia de 5 perfiles de restricción diferentes en el caso de la rizósfera de *C. hystrix*, de los cuales 4 fueron únicos (perfiles U) y 1 se encontró repetido en más de una muestra (perfil A). Por su parte, los clones derivados del suelo presentaron un total de 8 perfiles de restricción diferentes correspondientes a 5 perfiles únicos (perfiles Z) y 3 perfiles que se encontraron repetidos (perfiles B, C, D). En la Tabla 7 se muestran las abundancias relativas de cada uno de estos perfiles.

Tabla 7. Abundancia relativa de los diferentes haplotipos del gen 16S rDNA de β proteobacterias a partir de los cultivos aislados

RFLP Rizósfera (n [*] =7)	Abundancia relativa (%)	RFLP Suelo (n [*] =12)	Abundancia relativa (%)
A	42,85	B	16,67
U ^{**}	57,14	C	16,67
Total	100,0	D	25,00
		Z [*]	41,67
		Total	100,0

(*) La letra n corresponde al número total de los clones analizados

(**) Las letras U y Z agrupan aquellos clones de la rizósfera y el suelo respectivamente que presentaron perfiles de restricción únicos.

No se observaron perfiles de restricción compartidos entre las muestras de la rizósfera y el suelo, a diferencia de lo ocurrido en el caso de los clones.

2.3 Determinación de la diversidad bacteriana mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S de las β proteobacterias a partir de los clones y las colonias aisladas

Un representante de cada perfil de restricción (RFLP), tanto para los clones como para las bacterias aisladas y cultivadas, se seleccionó para determinar la secuencia del gen que codifica para el RNA 16S.

A partir de la herramienta bioinformática BLAST se descargaron aquellas secuencias que alcanzaron un porcentaje de similitud superior al 80%, con las secuencias de los clones y un 98% en el caso de las secuencias de los aislados. Las secuencias de los clones y los cultivos se analizaron por separado mediante el programa Bioedit y luego se construyó un dendrograma para cada análisis mediante el programa Treecon. En la Figura 9 se presenta el dendrograma obtenido a partir del análisis de las secuencias de los clones.

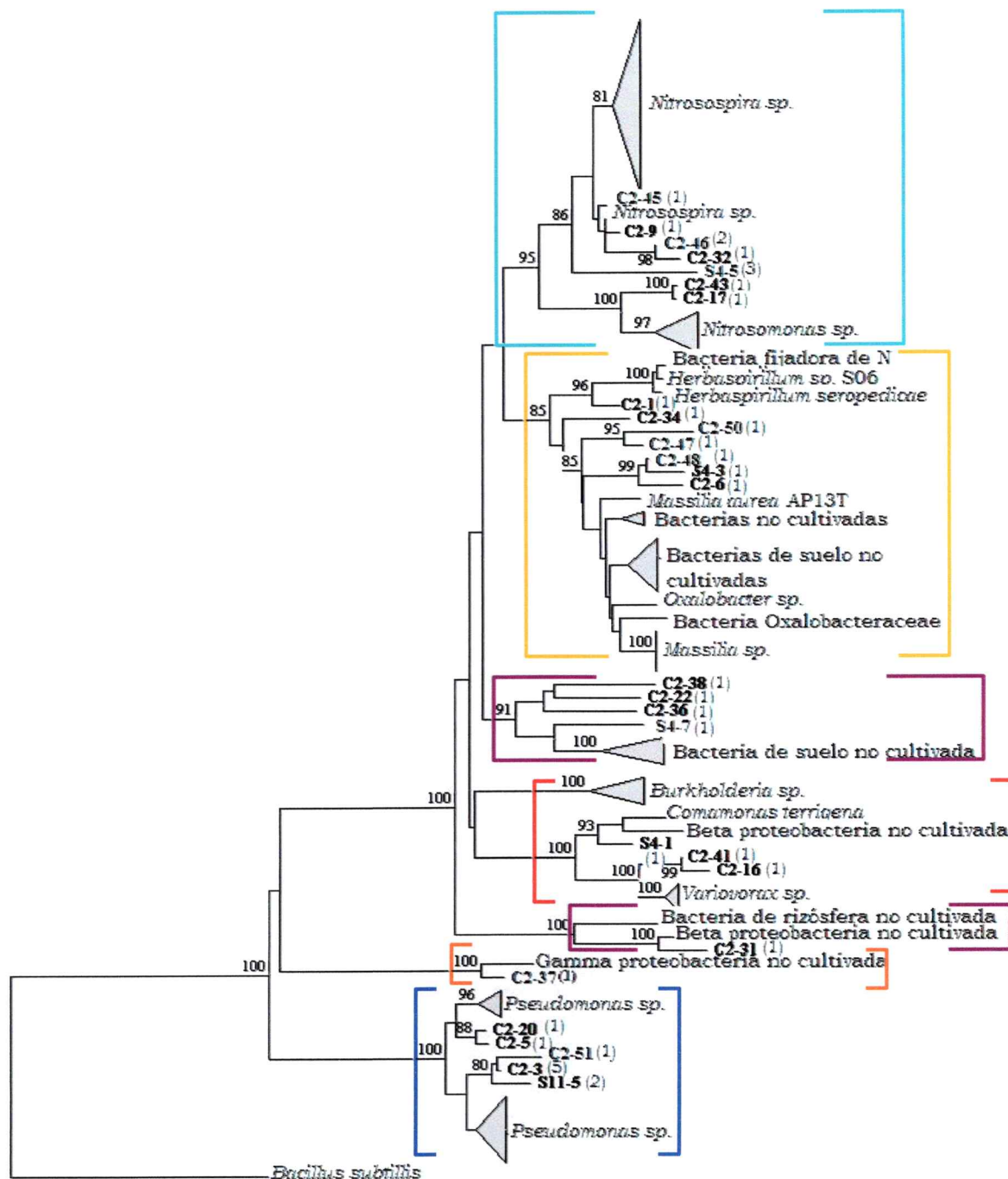


Figura 9. Árbol filogenético para el gen 16S rDNA específico de las β -proteobacterias. Las distancias relativas se calcularon utilizando el índice de distancia de Jukes & Cantor mediante el método de *Neighbour Joining*. Se realizó un *bootstrap* de 100 repeticiones, se muestran los valores ≥ 60 . En negrita los clones obtenidos y secuenciados. Los clones con la letra "C" se derivaron de las muestras de la rizósfera. Los clones con la letra "S" se derivaron de las muestras del suelo sin cobertura vegetal. Los números entre paréntesis indican el número de clones que presentaron el mismo perfil de RFLP. La raíz del árbol corresponde a *Bacillus subtilis*.

Podemos observar que nuestras muestras se relacionan con los organismos de distintos linajes filogenéticos. El recuadro celeste corresponde a los microorganismos quimiolitotóxicos oxidadores de amonio pertenecientes a los géneros *Nitrospira* y *Nitrosomonas*. Los recuadros amarillo y rojo se componen de los microorganismos pertenecientes a diversos géneros dentro de las familias Oxalobacteraceae y Comamonadaceae respectivamente, ambos dentro del orden de los Burkholderiales. Los recuadros de color morado corresponden a diversos clones ambientales de los microorganismos no cultivados pertenecientes a las β proteobacterias. El grupo de color naranja se asocia a los clones ambientales no cultivados de γ proteobacterias y finalmente el grupo en azul se asocia a los organismos del género *Pseudomonas*.

Debido a que nuestro objetivo principal corresponde a la caracterización de los oxidadores de amonio, se realizó un sub-agrupamiento en el cual se incluyeron sólo aquellos clones que se alinearon con secuencias pertenecientes a las BOA, (recuadro celeste en la Figura 9) con un porcentaje de similitud superior al 90%. Del total de los clones obtenidos, 10 de ellos se alinearon con estas secuencias y fueron entonces incluidos en el dendrograma que se muestra en la Figura 10.

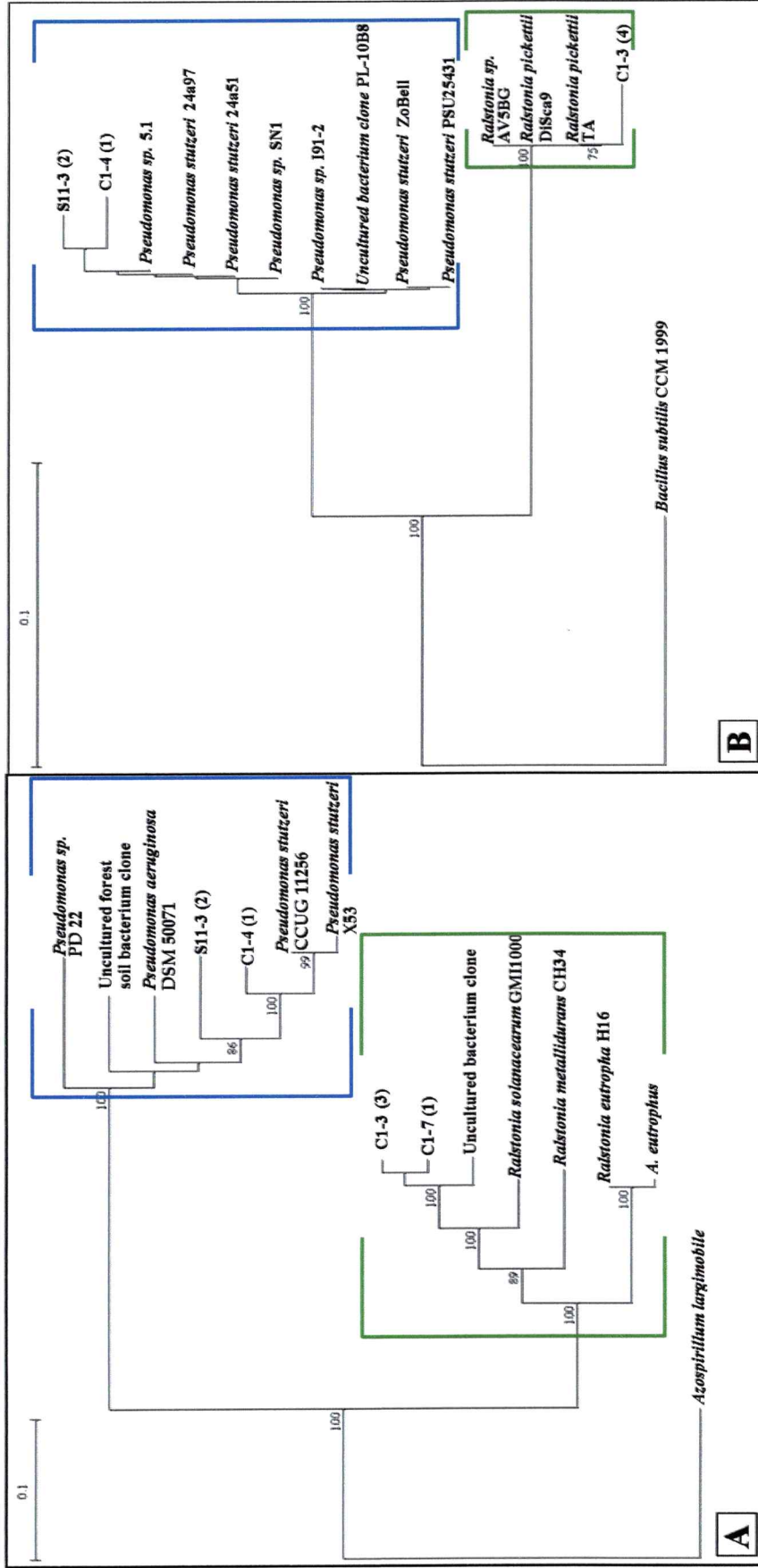


Figura 16. Dendrograma mostrando las relaciones de las secuencias de los genes *nosZ* y 16S rDNA. El árbol se construyó mediante el índice de distancia de Jukes y Cantor mediante el método de *Neighbor-Joining*. Se indican los valores de *bootstrap* ≥ 60 . **(A)** Árbol para el gen *nosZ*. **(B)** Árbol para el rDNA 16S. Los números entre paréntesis indican la cantidad de clones que presentaron el mismo patrón de RFLP. Los árboles fueron enraizados con *Azospirillum largimobile* para el gen *nosZ* y *Bacillus subtilis* para el caso del gen 16S rDNA.

3.6. Amplificación y secuenciación del gen funcional *nirS*

Además de amplificar los genes ya descritos, se intentó amplificar el gen *nirS*, que codifica para la enzima nitrito reductasa. Las muestras analizadas fueron aquellas previamente secuenciadas para los genes *nosZ* y *16S* (muestras C1-3, C1-4, C1-7, S11-3). De ellas, sólo las muestras C1-4 y S11-3 dieron positivas en la amplificación del gen *nirS* y se enviaron a secuenciar. Las secuencias obtenidas se alinearon entre sí y con secuencias obtenidas a partir de la base de datos, dando como resultado el dendrograma que se observa en la figura 17.

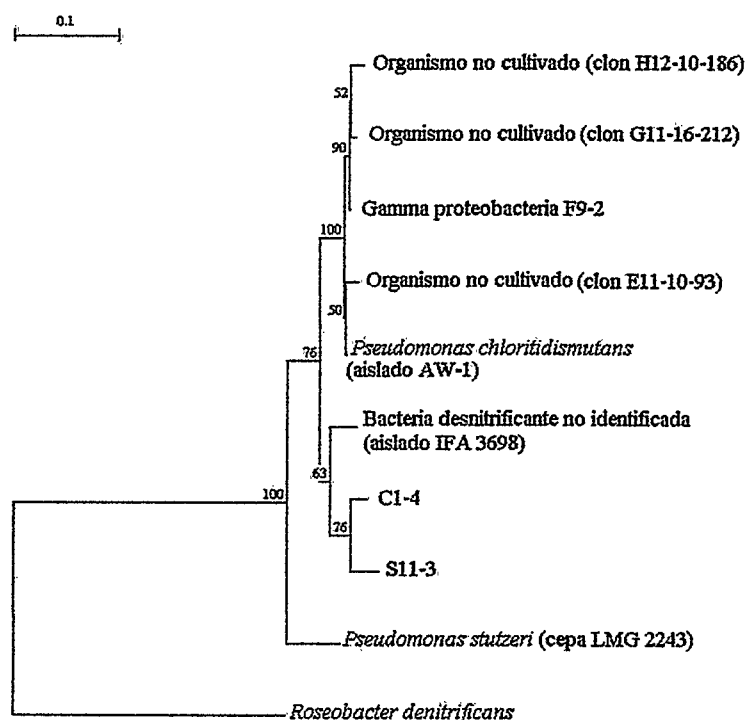


Figura 17. Dendrograma mostrando las relaciones entre las secuencias del gen *nirS*. El árbol se construyó utilizando el índice de distancia Jukes y Cantor mediante el método de *Neighbor-Joining*. Se indican los valores de bootstrap ≥ 50 . La raíz del árbol corresponde a *Roseobacter denitrificans*.

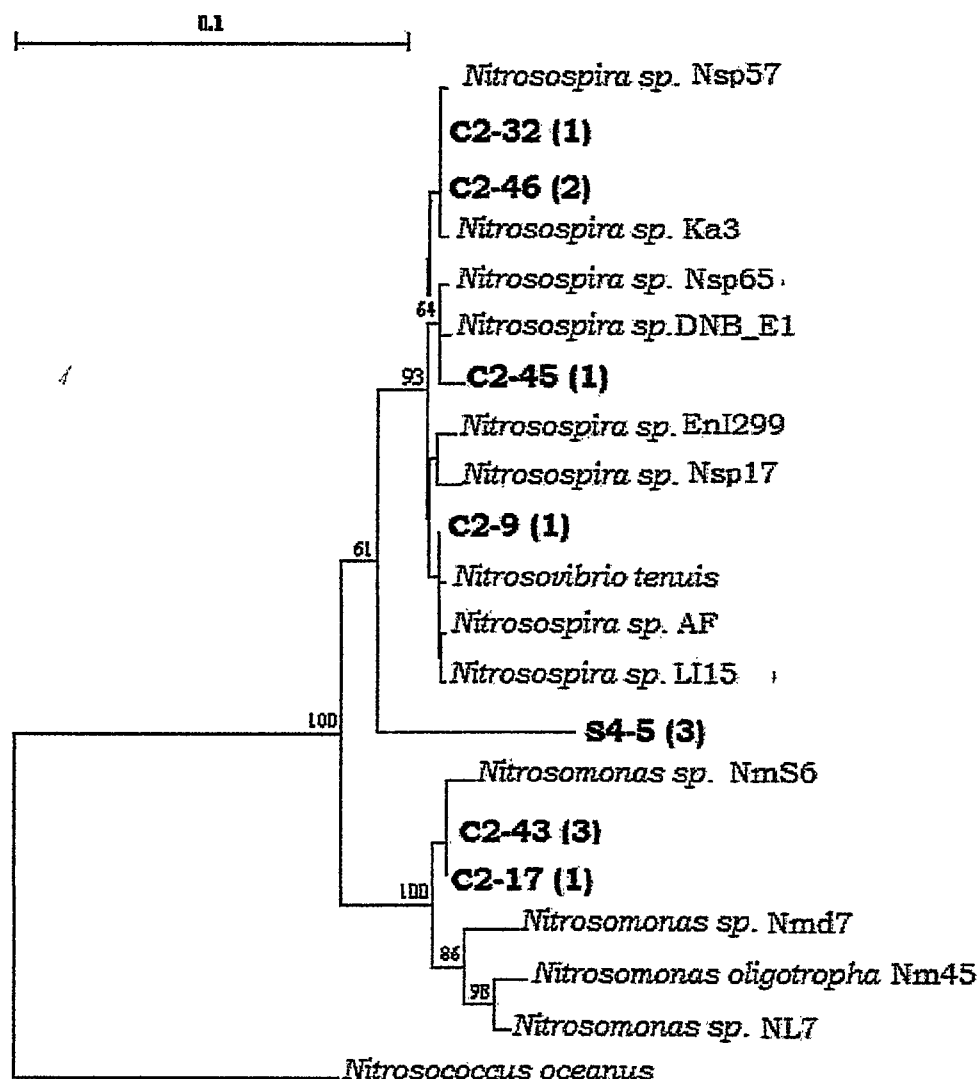


Figura 10. Árbol filogenético para el gen 16S rDNA de las BOA. La distancia relativa se calculó utilizando el índice de distancia de Jukes & Cantor mediante el método de *Neighbour Joining*. Se realizó un análisis de *bootstrap* de 100 repeticiones para evaluar la robustez de los nodos. Se muestran los valores ≥ 60 . Los números entre paréntesis indican el número de los clones que presentaron el mismo perfil de RFLP.

Podemos observar en la figura 10 que los clones se agruparon en 2 ramas principales, una correspondiente a *Nitrosospira* y la otra correspondiente a *Nitrosomonas*. Cinco clones obtenidos a partir de la librería de la rizósfera de *C. hystrix* se agruparon dentro de la rama de las *Nitrosospira*, además hay 3 clones representados por S4-5 que quedaron fuera de la rama de las *Nitrosospira*, pero que

están estrechamente relacionados con este grupo ya que presentaron un 95% de similitud con esas secuencias según el análisis mediante BLAST. Cuatro clones derivados de la rizósfera, se ubicaron dentro de la rama de las *Nitrosomonas* mientras que ningún representante del suelo sin cobertura vegetal se encontró relacionado con las bacterias de este género. Los altos valores de *bootstrap* (93%, 61% y 100%) confirman estos agrupamientos.

A continuación en la Figura 11 se presenta el dendrograma obtenido a partir del análisis de las secuencias de los cultivos aislados.

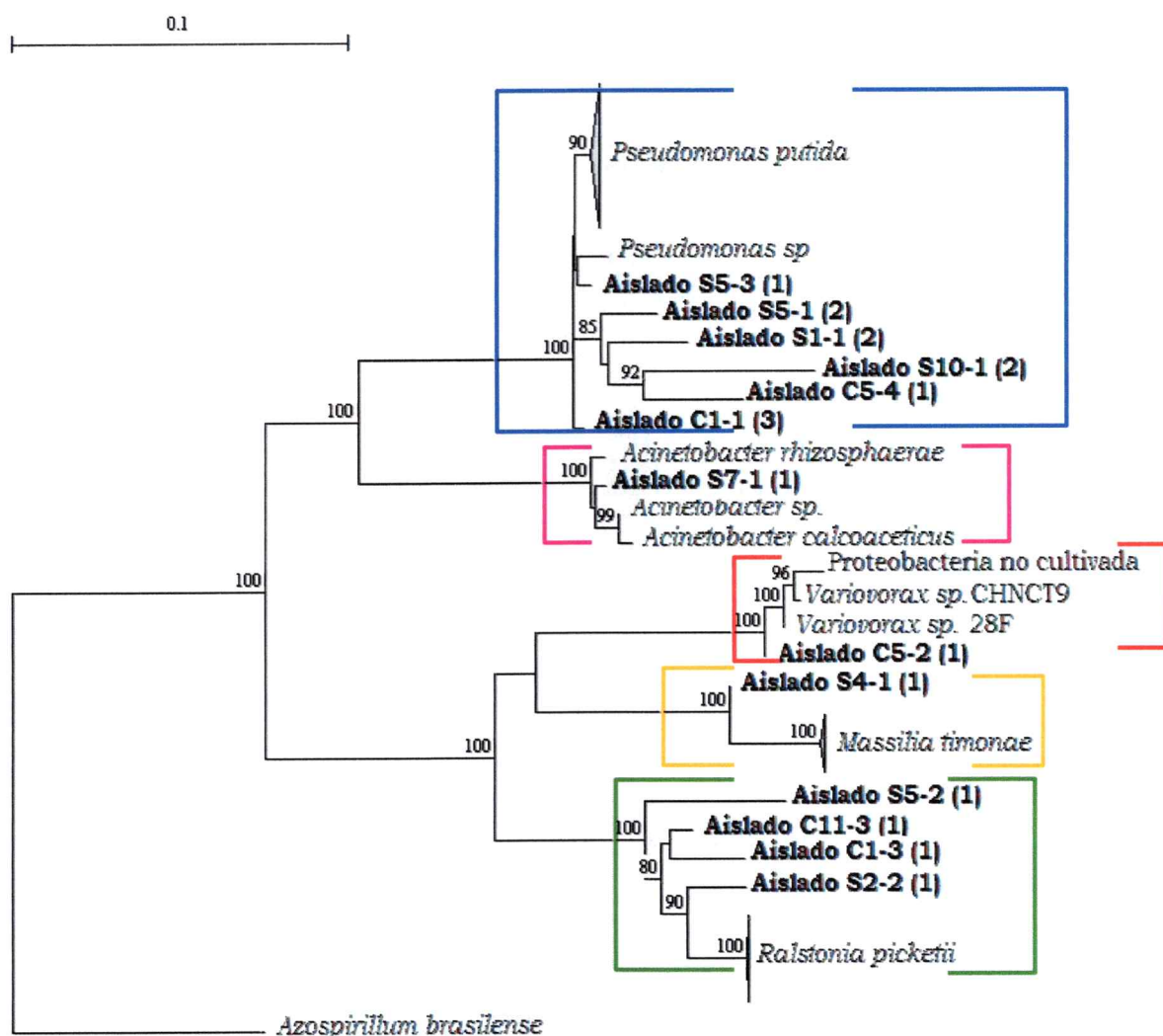


Figura 11. Árbol filogenético para el gen 16S rDNA de β proteobacterias de las bacterias aisladas y cultivadas. La distancia relativa se calculó mediante el índice de distancia de Jukes y Cantor con el método de *Neighbour Joining*. Se realizó un análisis de *bootstrap* de 100 repeticiones para evaluar la robustez de los nodos. Se muestran los valores ≥ 60 . Los números entre paréntesis indican el número de aislados que presentó el mismo perfil de RFLP. El árbol fue enraizado con *Azospirillum brasilense*.

A diferencia de los clones, ninguno de los aislados obtenidos se relacionó filogenéticamente con los microorganismos oxidadores de amonio pertenecientes a la subclase de las β proteobacterias. La mayoría de los aislados se relacionó con los géneros *Ralstonia* y *Pseudomonas*. También podemos observar que las muestras no se agrupan de acuerdo a su origen (rizósfera o suelo sin cobertura). Los altos valores de *bootstrap* en los nodos (sobre el 80%) confirman la validez de estos agrupamientos.

3. Composición del gremio de bacterias desnitrificantes del suelo y la rizósfera actinorrífica.

3.1. Cultivo y aislamiento de los microorganismos desnitrificantes

A partir de las muestras de la rizósfera y el suelo sin cobertura se procedió a aislar y cultivar las bacterias desnitrificantes. Para ello se realizaron diluciones seriadas de una suspensión de suelo, y se incubaron a 27°C en medio DNB sólido según lo descrito en Materiales y Métodos. Las colonias aisladas se inocularon en tubos con campanas de Durham invertidas, para atrapar los gases producidos durante el proceso de desnitrificación. Siete colonias cultivadas fueron positivas en la producción del gas, lo que sugiere que podría tratarse de bacterias desnitrificantes (Tabla 8).

Tabla 8.- Producción de gas a partir de los cultivos DNB aislados

Origen de las muestras	Nº de colonias analizadas	Nº de colonias positivas en el ensayo de producción de gas	% colonias positivas
Rizósfera (C)	12	5	41,67%
Suelo (S)	4	2	50%

En la Figura 12 A y B se muestra la formación de una burbuja de aire en el interior de las campanas, lo cual indica la producción de gas por parte del microorganismo y se considera como colonia positiva en el ensayo. En la Figura 12 C se muestra a modo de ejemplo un cultivo que fue negativo en la producción de gas (muestra C1-2).



Figura 12. Ensayo de producción de gas determinada mediante el método de cultivo en medio DNB con campanas Durham invertidas. **A.** Aislados de suelo: S11-1, S11-3, **B.** Aislados de rizósfera: C1-1, C1-3, C1-4, C1-7, C3-1. Se observa la formación de una burbuja en la campana que indica la producción de gas. **C.** Cultivo negativo para la formación de burbuja (muestra C1-2).

3.2. Amplificación del gen *nosZ*

Para determinar si los cultivos productores de gas corresponden a bacterias desnitrificantes, se procedió a determinar la presencia del gen funcional *nosZ* que codifica para la enzima óxido nítrico reductasa mediante amplificación por PCR con primarios específicos. Todos los cultivos positivos en la producción del gas dieron como resultado una banda de aproximadamente 700 pb que corresponde al tamaño esperado de la región amplificada (Figura 13 A). En el ensayo de amplificación se incluyó un cultivo negativo (muestra C1-2, Figura 12 C) en la producción del gas, el cual resultó negativo para la amplificación del gen *nosZ*. La Fig.13 A, carril 2, muestra que el cultivo C1-2 no produce el fragmento esperado. De manera paralela se intentó amplificar el gen *nosZ* a partir del DNA extraído directamente de muestras de suelo tratadas durante 12 horas con medio DNB. Estas muestras se esperaba estuvieran enriquecidas en la fracción heterotrófica y por lo tanto fuera posible

amplificar directamente el gen *nosZ* sin previo cultivo. Se realizaron varios ensayos de amplificación directa a partir del DNA purificado de muestras de suelo, sin embargo, no fue posible obtener amplificación. En la Figura 13 B se muestra uno de estos ensayos, donde no se detectó la amplificación del gen *nosZ* para ninguna de las diluciones del DNA evaluadas y, por lo tanto, se continuó trabajando con los cultivos aislados.

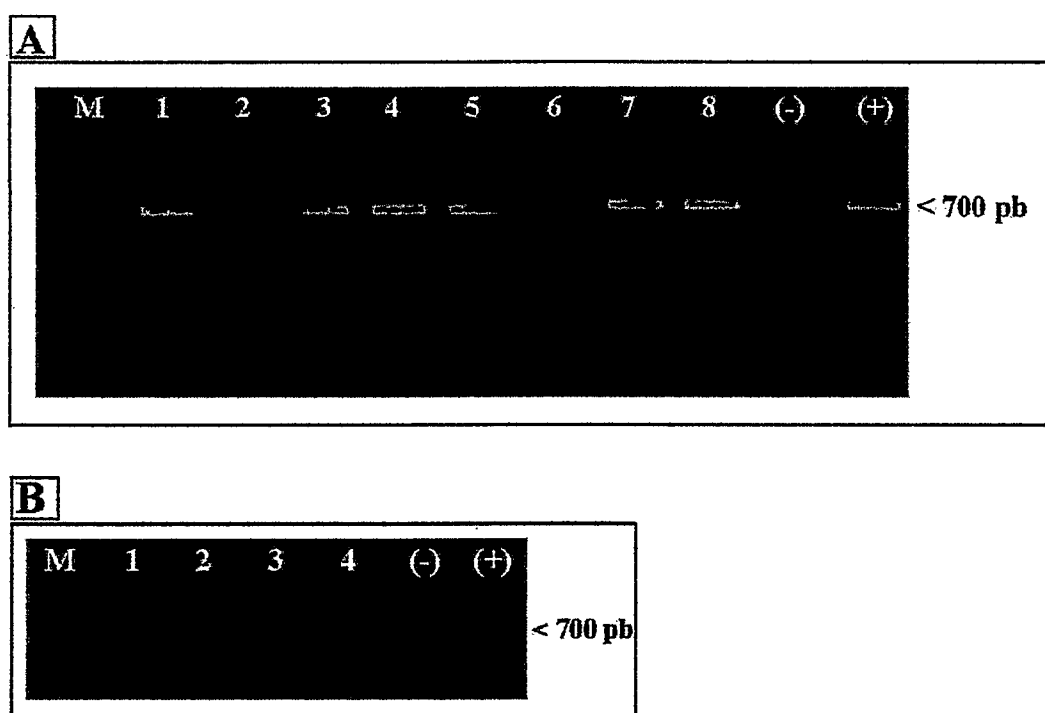


Figura 13. Productos de la amplificación del gen *nosZ* resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1,2 %.

(A) Amplificación usando como templado el DNA de los cultivos. M: marcador de peso molecular 100 bp; aislados de la rizósfera, 1: C1-1; 2: C1-2; 3: C1-3; 4: C1-4; 5: C1-7; 6: C3-1; y aislados del suelo, 7: S11-1; 8: S11-3.

(B) Amplificación usando como templado el DNA extraído directamente de las muestras de rizósfera o de suelo. M: marcador de peso molecular 100 bp; 1-3: rizósfera; 4: suelo sin cobertura. (+) Control positivo; (-) control negativo. La flecha muestra la banda del tamaño esperado (700 pb).

3.3. Amplificación del gen ribosomal 16S a partir de los aislados obtenidos

Para la identificación de los cultivos de bacterias desnitrificantes, todos los cultivos positivos para el gen *nosZ* se ensayaron para la amplificación del gen para el RNA ribosomal 16S. El resultado de la amplificación se presenta en la Figura 14.

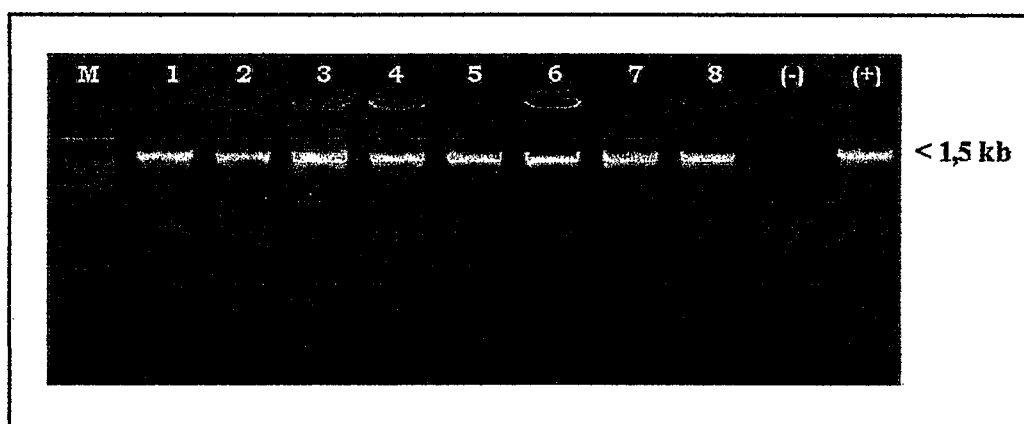


Figura 14. Productos de la amplificación del rDNA 16S de cultivos en medio DNB visualizados en gel de agarosa al 1.2%. Amplificación usando como templado DNA de cultivos.

M: marcador de peso molecular 100 bp; **Aislados de rizósfera** 1: C1-1; 2: C1-2; 3: C1-3; 4: C1-4; 5: C1-7; 6: C3-1; y **aislados de suelo**. 7: S11-1; 8: S11-3. (-) control negativo; (+) control positivo. La flecha indica la banda del tamaño esperado (1,5 kb).

En todas las muestras analizadas se observa amplificación, incluyendo la muestra C1-2 que no presentó formación de burbuja en el cultivo con la campana de Durham (Fig. 12 C; Fig. 14, carril 2). Este resultado descarta que la falta de amplificación de esta muestra para el gen *nosZ* haya sido por mala calidad del templado.

3.4. Análisis de los cultivos denitrificantes mediante RFLP

Los amplicones de los cultivos, tanto para el gen *nosZ* como para el rDNA 16S, se digirieron con la enzima *Hae*III y sus perfiles de RFLP fueron posteriormente analizados por electroforesis en un gel de acrilamida al 8%. En la Figura 15 se observa el resultado tanto para el gen *nosZ* (Fig.15 A) como para el rDNA 16S (Fig.15 B).

Cuando se analiza el perfil de RFLP de los amplicones para el gen *nosZ* se observa que las muestras C1-1, C1-3 y C3-1 (Fig.15 A, carriles 1, 3, 6) presentaron un patrón de restricción común, así como también la muestra S11-1 con S11-3 (Fig.15 A, carriles 7, 8). Por el contrario, las muestras C1-4 y C1-7 presentaron un patrón de restricción propio de cada muestra (Fig.15 A, carriles 5 y 6).

Al analizar el gel correspondiente a los perfiles de RFLP para el gen que codifica el RNA ribosomal 16S se observa nuevamente que S11-1 y S11-3 compartieron el mismo perfil (Fig.15 B, carriles 7 y 8). Por su parte las muestras C1-1, C1-3, C3-1 y C1-7 también mostraron el mismo perfil de restricción (Fig.15 B, carriles 1, 3, 5 y 6), a diferencia de lo ocurrido con el gen *nosZ* donde la muestra C1-7 presentaba un perfil propio. La muestra C1-4 volvió a diferenciarse del resto de las muestras presentando un perfil único. Se escogió un representante de cada perfil de restricción diferente para obtener la secuencia de los genes *nosZ* y rDNA 16S.

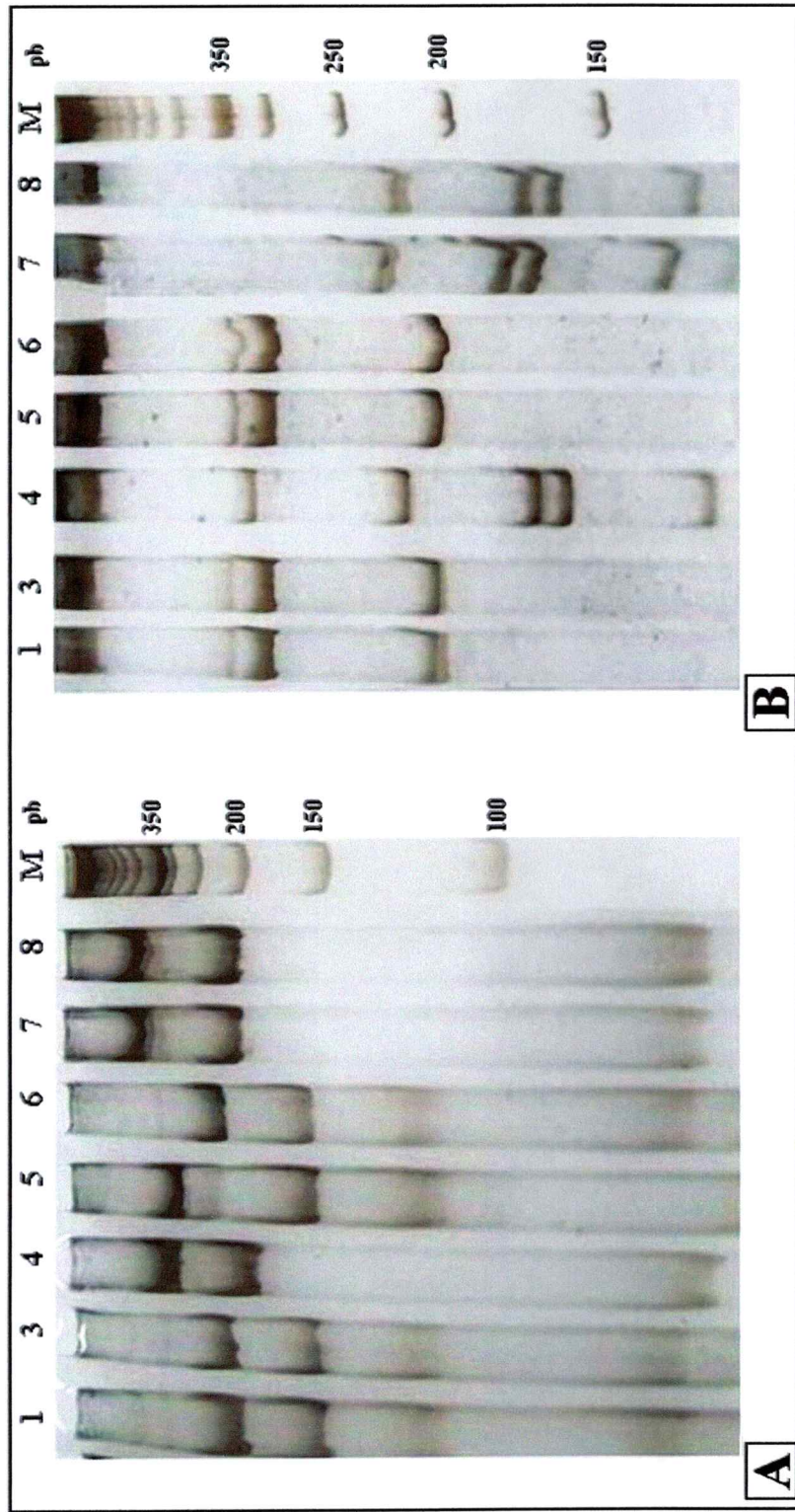


Figura 15. Patrones de RFLP de los cultivos desnitrificantes determinados por electroforesis en gel de acrilamida al 8% teñido con nitrato de plata. **Aislados de la rizósfera, 1:** C1-1; **3:** C1-3; **4:** C1-4; **5:** C1-7; **6:** C3-1 y **aislados del suelo sin cobertura: 7:** S11-1; **8:** S11-3; **M:** marcador de peso molecular 50 bp (A) Gen *nosZ*. (B) rDNA 16S.

3.5. Identificación de los cultivos desnitrificantes mediante la secuenciación del gen *nosZ* y del gen para el RNA ribosomal 16S.

En el caso del gen *nosZ* se secuenciaron las 4 muestras que representan los diferentes perfiles de RFLP obtenidos, y para el gen 16S rDNA se secuenciaron las 3 muestras que representan los 3 RFLP diferentes que se observaron.

Las secuencias obtenidas en cada caso se alinearon entre sí y se compararon con las secuencias de organismos conocidos obtenidas a partir de la base de datos (GeneBank) mediante la herramienta bioinformática BLAST y el programa de alineación de secuencias Bioedit. A partir de estos alineamientos se construyeron dos árboles filogenéticos correspondientes al alineamiento obtenido para el gen *nosZ* (Figura 16 A) y para el rDNA 16S (Figura 16 B), respectivamente. Los aislados obtenidos se asociaron a las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Ralstonia*. En la parte superior de cada árbol (Fig.16, recuadro azul) se observa que dos muestras de suelo con igual perfil de RFLP, representadas por S11-3, y una muestra de rizósfera, C1-4, se asociaron a una rama correspondiente a *Pseudomonas sp.* En la parte inferior, en ambos árboles se observa que los aislados de la rizósfera, C1-3 y C1-7 se asociaron a otra rama que agrupa las bacterias del género *Ralstonia sp.* (Fig. 16, recuadro verde) con un valor de *bootstrap* de 100. Los otros aislados de las bacterias desnitrificantes, obtenidos a partir de las muestras de la rizósfera, compartieron el mismo patrón de RFLP para ambos genes, lo que sugiere que corresponden a bacterias relacionadas con *Ralstonia sp.*

DISCUSIÓN

Las comunidades microbianas del suelo y los procesos biogeoquímicos que ellas median son críticas para el correcto funcionamiento y mantenimiento de los ecosistemas terrestres (Kent y Triplett, 2002).

La mayoría de los estudios sobre el efecto de las plantas en la estructura de las comunidades microbianas se realizó en praderas o especies vegetales de interés agrícola (Smit y col., 2001; Steenwerth y col., 2003). Sin embargo, existe poca información sobre las comunidades microbianas asociadas a las especies vegetales pioneras. Éstas se encuentran relacionadas con las etapas tempranas dentro de la sucesión vegetal, y son capaces de colonizar los suelos pobres en nutrientes en los ecosistemas semiáridos (Orlando y col., 2007).

En este Seminario de Título se abordó el estudio de la composición de los gremios bacterianos responsables de las principales transformaciones del nitrógeno en el suelo semiárido utilizando como modelo de estudio al suelo asociado a la planta *Colletia hystrix*, una especie dominante en el matorral esclerófilo de Chile central.

Diversidad genética del gremio de las bacterias fijadoras de nitrógeno

Para el estudio de las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN), se realizó un PCR semianidado, con el fin de aumentar la sensibilidad de detección del método. Para la primera etapa del PCR se escogieron los partidores *nifH* F y *nifH* R ya que éstos amplifican un segmento blanco del gen *nifH* en un amplio rango de microorganismos fijadores de N₂ (Rösch y col., 2002). Esta aproximación metodológica fue necesaria ya que se ha reportado que las BFN se encuentran en baja abundancia (~5%) con respecto a la comunidad bacteriana total (Mergel y col., 2001)

y probablemente están a una concentración inferior al límite de detección en un PCR directo.

Las muestras amplificadas provenientes de la rizósfera de *C. hystrix*, en general presentaron bandas más intensas que las provenientes del suelo sin cobertura (Fig 3), lo cual sugiere que podría haber mayor abundancia de BFN en la rizósfera de *C. hystrix* que en el suelo sin cobertura vegetal. Más aún, a partir de la muestra de rizósfera se obtuvo un mayor número de clones positivos (91%) que con la muestra del suelo sin cobertura vegetal (56%). La mayor abundancia de los diazótrofos en la rizósfera podría ser explicada por el hecho de que estas bacterias están estimuladas y su actividad nitrogenasa aumenta en presencia de mayores niveles de materia orgánica en el suelo. La rizósfera es una zona con elevada concentración de compuestos orgánicos fácilmente degradables debido a la exudación radical, razón por la cual las bacterias fijadoras libres encuentran en la rizósfera un lugar muy apropiado para fijar el nitrógeno (Berkum y Bohlool, 1980; Glick, 1995).

Por otra parte cabe mencionar que aunque la concentración de DNA obtenida en la rizósfera fue mayor que en el suelo sin cobertura vegetal, (3.4 ng/ul y 2.2 ng/ul respectivamente) la composición de BFN obtenida a partir de los clones podría no ser totalmente representativa debido a que la extracción del DNA generalmente resulta en una coextracción de sustancias húmicas, las cuales se encuentran en mayor abundancia en la rizósfera, ya que provienen de la degradación de la materia orgánica, principalmente de la lignina (Kordel y col., 1997). Estos compuestos interfieren con la cuantificación del DNA, inhiben la *Taq* DNA polimerasa en el PCR, afectan la digestión de las endonucleasas y reducen la eficiencia y la

especificidad de la hibridación del DNA, ya que compiten con los ácidos nucleicos (Zhou y col., 1996).

El análisis por RFLP muestra que los clones del gen *nifH* obtenidos a partir de la rizósfera de *Colletia hystrix* presentaron un mayor número de haplotipos diferentes (36 perfiles) que los obtenidos a partir de las muestras del suelo sin cobertura vegetal (12 perfiles). En estos últimos alrededor del 70% de los clones está repartido entre sólo dos perfiles (Tabla 3., perfiles L y M). Por el contrario, en los clones provenientes de la rizósfera, los dos perfiles más frecuentes apenas superan, en conjunto, el 30% de abundancia relativa (Tabla 3., perfiles A y B). La distribución de los perfiles de RFLP de ambas muestras sugiere que hay una mayor diversidad del gen *nifH* en la rizósfera de *C. hystrix* que en el suelo adyacente fuera del dosel, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Chávez (2004), quien reportó mediante el análisis de T-RFLP una mayor diversidad del gremio fijador de nitrógeno en la rizósfera de *C. hystrix* comparada con la registrada en el suelo sin cobertura vegetal.

En el análisis filogenético realizado mediante la secuenciación de los clones (Figura 5), se observó que los clones con perfiles de RFLP diferentes se agrupan en una misma rama. Esto nos sugiere que el gen funcional *nifH* presentaría una alta variabilidad a nivel de su secuencia, aun entre organismos muy relacionados filogenéticamente. Por otra parte, es probable que los clones con idéntico RFLP tengan diferencias en sus secuencias ya que el análisis de RFLP realizado sólo entrega información sobre los sitios de corte de la enzima *HaeIII*. Por lo tanto, la diversidad genética del gen *nifH* se encuentra subestimada tanto para la rizósfera como el suelo, ya que no se analizó la secuencia de todos los clones obtenidos sino que sólo la de aquéllos con diferente perfil de RFLP para esa enzima.

El análisis filogenético mostró también que las secuencias del gen *nifH* derivadas de la rizósfera actinorrícica y del suelo sin cobertura se relacionan con los miembros del género *Azospirillum* (Figura 5, recuadro amarillo). En el caso de la rizósfera, las bacterias de este género han sido reportadas dentro de los diazótrofes más abundantes (Berkum y Bohlool, 1980) independientemente del tipo de suelo o del origen geográfico de éste (Bashan, 1998). De este modo no es sorprendente que gran parte de los clones obtenidos a partir de la rizósfera actinorrícica se hayan asociado con *Azospirillum*. Sin embargo, hay información que indica que en el suelo que se encuentra fuera de la región rizosférica (suelo sin cobertura), principalmente en zonas con climas templados y semiáridos, estas bacterias presentan un pobre establecimiento y supervivencia (De Coninck y col., 1988; Vandenhove y col., 1993; Bashan, 1998) lo cual difiere de nuestros resultados.

El género *Azospirillum* es utilizado como biofertilizante y bioestimulante (García y col., 2007) por su capacidad para asociarse con las plantas de interés agrícola. La inoculación con *Azospirillum* produce un aumento de la masa radicular, debido a la capacidad de producir fitohormonas. Éstas promueven la elongación radical e incrementan las ramificaciones laterales por lo que aumenta el área radical. Se ha demostrado que las plantas inoculadas con esta bacteria absorben más rápido los minerales de la solución y, consecuentemente, acumulan más materia seca, N, P y K en tallos y hojas (Puente y Peticari, 2006). No obstante, la liberación de *Azospirillum spp.* en suelos de manera previa a la inoculación de las semillas posee una larga historia de impredecibles y decepcionantes resultados (Bashan y Levanony, 1990; Bashan, 1998). De esta manera, la presencia de este género bacteriano en un suelo semiárido como lo es el suelo de El Romeral, podría ser de gran interés

biotecnológico si se logran aislar las cepas y evaluar su uso como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal de las especies de interés agrícola en los suelos pobres. Es importante considerar también la posibilidad de que estas supuestas cepas de *Azospirillum* no se encuentren necesariamente activas *in situ*, pudiendo encontrarse en estado vegetativo o en forma de quistes hasta que una planta huésped se encuentre disponible (Bashan 1998).

Además de *Azospirillum*, se encontró que algunos clones de la rizósfera de *C. hystrix* se relacionaron filogenéticamente con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Figura 5., recuadro verde). Estas bacterias, salvo excepciones (Dreyfus y col., 1983), corresponden a diazotrofos capaces de fijar nitrógeno solamente cuando se encuentran en simbiosis con leguminosas (Hussein, 1999). Es tal vez por este motivo que únicamente los clones provenientes de la rizósfera se hayan asociado con estos géneros bacterianos, ya que este ambiente presenta una concentración de nitrógeno biológicamente disponible mucho mayor que la presente en el suelo sin cobertura, lo cual permitiría la existencia de bacterias rizobiales aún sin fijar N.

Llama la atención que entre los clones obtenidos ninguno se identificó con el actinomicete *Frankia*. Cabe destacar que el sector de muestreo corresponde a un parche vegetacional de *Colletia hystrix*, cuyas plantas se encuentran noduladas por bacterias del género *Frankia* (Chavez y Carú, 2006), por lo cual sería esperable encontrar clones del gen *nifH* relacionados con este actinomicete. La ausencia de secuencias que se relacionan con *Frankia*, sugiere que este diazotrófo se encuentra en muy baja abundancia en el suelo y en la rizósfera de *C. hystrix* y no fue detectable en la amplificación por PCR. Estudios previos han reportado que la abundancia de

Frankia en suelos es considerablemente menor a la de las especies de los géneros de *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Chávez, 2004). La ausencia de clones de *Frankia* en este estudio, también sugiere que el principal hábitat de este actinomicete en el matorral podría estar restringido a los nódulos radiculares de sus plantas hospedadoras.

Diversidad genética del gremio de las bacterias nitrificantes

El estudio de las bacterias oxidadoras de amonio se realizó mediante dos aproximaciones, una independiente y otra dependiente de cultivo.

Se utilizó la técnica de PCR anidado para la amplificación del rDNA 16S con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad del método en la detección de este gen.

Aunque los partidores escogidos debían ser específicos para los oxidadores de amonio de la subdivisión β de las proteobacterias, podemos ver en la Figura 9, correspondiente al análisis de los clones obtenidos, que esto no ocurrió del todo así. Vemos que los partidores, si bien amplificaron las secuencias esperadas, también amplificaron secuencias pertenecientes a β proteobacterias no oxidadoras de amonio (recuadros amarillo, morado y rojo, figura 9). Más aún, algunos de los clones se alinearon con organismos de la subdivisión γ de las proteobacterias (recuadros azul y naranja, figura 9). Sin embargo, esto no es completamente inesperado. Los partidores β amo (McCaig y col., 1994) se diseñaron con la intención de recuperar una gran porción (1,1 kb) del 16S rDNA a partir de todos los oxidadores de amonio pertenecientes a la subclase de las β proteobacterias presentes en una muestra. Para ello, los partidores se diseñaron con una baja especificidad para permitir la amplificación de no sólo los organismos blanco, sino que también de sus parientes más cercanos por fuera de la radiación de los oxidadores de amonio. Mientras que

esta baja especificidad resultaba ventajosa en la generación de nuevos datos de secuencias, las librerías de clones generadas a partir de estos suelos además contenían una alta proporción de secuencias (hasta un 70%) que caían fuera del grupo blanco, lo cual explicaría los resultados obtenidos.

Por su parte, Mahmood y col. (2006), demostraron que la estrategia de amplificar el gen 16S rDNA mediante un PCR utilizando los partidores β amo entrega una mayor diversidad de secuencias que otros acercamientos utilizados para el suelo, pero también genera una mayor cantidad de secuencias no BOA. Sin embargo, se acepta el uso de estos partidores ya que en muchos casos son capaces de amplificar cepas del tipo *Nitrospira* que no pueden ser amplificadas con otros partidores, razón por la cual decidimos continuar el estudio con este juego de partidores.

En la figura 10 se muestra un subagrupamiento obtenido utilizando sólo las secuencias pertenecientes a los oxidadores de amonio. Podemos ver que si bien los clones se agrupan tanto con las bacterias del género *Nitrosomonas* como con las de *Nitrospira*, la mayoría se agrupa con este último género. Esto es esperable si consideramos que en los ecosistemas terrestres se ha reportado una predominancia del género *Nitrospira* sobre *Nitrosomonas* (Kowalchuk y Stephen 2001).

Los clones representados por S4-5 no quedaron dentro de ninguna de las ramas del árbol. Sin embargo, en el análisis mediante BLAST presentaron un porcentaje de similitud del 95% con las bacterias del género *Nitrospira*.

En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos luego del cultivo y el aislamiento de los supuestos oxidadores de amonio a partir de muestras de suelo.

Podemos ver que, a diferencia de los clones, ninguno de los aislados obtenidos se relaciona filogenéticamente con los microorganismos oxidadores de amonio

pertenecientes a la subclase β de las proteobacterias. La mayoría de los aislados está relacionada con los géneros *Ralstonia* y *Pseudomonas*, ambos dentro de la subclase γ de las proteobacterias. No se ha reportado ningún antecedente que nos haga suponer que estos géneros bacterianos realizan el proceso de oxidación del amonio.

Resulta extraño el hecho que luego de todo el proceso de selección de los microorganismos oxidadores de amonio en un medio carente de fuentes de carbono sea posible obtener microorganismos heterotróficos como *Ralstonia* y *Pseudomonas*. Sin embargo, algunos estudios sugieren la existencia de especies de *Pseudomonas* (*Pseudomonas oxalaticus*) capaces de fijar CO_2 mediante el ciclo de Calvin en medios con limitaciones de carbono (Dijkhuizen y Harder, 1979).

La nitrificación autotrófica en los sistemas naturales se encuentra limitada por las dificultades en el aislamiento y cultivo de los microorganismos oxidadores de amonio (Stephen y col., 1996), debido a las bajas tasas de crecimiento, bajos rendimientos de biomasa y limitado número de caracteres fenotípicos distintivos (Prosser, 1989). Es por esto que la mejor manera de estudiar estos microorganismos es complementando las técnicas dependientes de cultivo con las técnicas moleculares independientes de cultivo, tal como fue realizado en el presente trabajo.

Diversidad genética del gremio de las bacterias desnitrificantes

Para el aislamiento de las bacterias desnitrificantes se utilizó un medio de cultivo rico en carbono y con nitrato (NO_3^-) como única fuente de nitrógeno, ya que las bacterias desnitrificantes son en su mayoría heterotróficas y capaces de utilizar los óxidos de nitrógeno como aceptores respiratorios de los electrones cuando hay déficit de oxígeno. Mediante la técnica de cultivo en agar blando (ver materiales y

métodos) se generó un ambiente bajo en oxígeno, el cual favorece la reacción de desnitrificación (Tiedje, 1988).

A continuación se evaluó la capacidad de producción de gas cuando crecen en medio nutritivo suplementado con nitrato. Para ello, las colonias seleccionadas se cultivaron en tubos provistos de una campana de Durham para recuperar el gas producido, el cual podría ser un indicador de la presencia de los posibles microorganismos desnitrificantes. Durante el proceso de desnitrificación las bacterias reducen al nitrato a nitrógeno molecular en varias etapas, donde hay intermediarios gaseosos tales como NO, N₂O y N₂. En la Tabla 8 se muestra que de las 16 colonias aisladas, 7 de ellas formaron burbuja en las campanas de Durham.

El siguiente criterio de identificación fue la presencia del gen *nosZ* en el genoma de los microorganismos cultivados. Para ello, se procedió a amplificar este gen, que codifica para la enzima óxido nitroso reductasa, la cual cataliza el paso del óxido nitroso (N₂O) a dinitrógeno (N₂). Tomando en cuenta estos criterios, podemos afirmar que las colonias aisladas corresponden a bacterias desnitrificantes.

Para comprobar que aquellas colonias que no produjeron gas en la campana no fueran falsos negativos, es decir, organismos desnitrificantes que por alguna razón no formaron burbuja, se eligió a uno de ellos (muestra C1-2, Figura 12 C) y se intentó amplificar el gen *nosZ* a partir de su genoma. En este caso la muestra también fue negativa para la amplificación de este gen. Sin embargo, la reacción de amplificación del gen ribosomal 16S fue positiva lo que descarta la posibilidad que el DNA templado no fuera amplificable bajo las condiciones del ensayo o por la calidad del DNA y sugiere que la bacteria aislada (C1-2) no es un desnitrificante.

En forma paralela, se intentó amplificar el gen *nosZ* a partir del DNA extraído directamente de las muestras de suelo, sin previo cultivo. Se utilizaron suelos tanto de la rizósfera como del suelo sin cobertura vegetal y en ninguno de los casos fue posible obtener un amplificado. Henry y col. (2006) indicaron mediante un PCR cuantitativo para los genes *nosZ* y *nirK* que la máxima abundancia de estos genes con respecto al gen ribosomal 16S alcanza un 5% a 6%, dando cuenta de la baja proporción de desnitrificadores con respecto al total de bacterias en los suelos. Esto podría explicar por qué no fue posible detectar a estos microorganismos mediante PCR directo, pero sí fue posible obtener microorganismos desnitrificadores mediante técnicas dependientes de cultivo, donde se estaría realizando una selección a favor de estas bacterias. Por lo tanto la identificación de las bacterias desnitrificantes en estos hábitat se continuó con las muestras obtenidas a través del cultivo.

Las colonias que dieron una reacción de amplificación positiva para los genes *nosZ* y 16S rDNA se sometieron a un análisis por RFLP, con el fin de seleccionar los clones diferentes. Algunas muestras compartieron perfiles de restricción tanto para el gen *nosZ* como para el gen ribosomal 16S. Otras, en cambio, presentaron perfiles únicos de restricción (Figura 15). Llama la atención que ninguna muestra de la rizósfera compartiera algún perfil con las muestras del suelo sin cobertura. Aunque el número de colonias aisladas fue bastante reducido, esta observación podría indicar que las bacterias desnitrificantes más abundantes o más fáciles de cultivar no son las mismas en estos dos hábitat estudiados.

El análisis filogenético realizado a partir de las secuencias de ambos genes reveló que nuestras muestras se asocian principalmente a las bacterias desnitrificantes de los géneros *Pseudomonas* y *Ralstonia* (Figura 16). Esto concuerda con la literatura,

donde se reportó al género *Pseudomonas* como el grupo bacteriano predominante en el proceso de desnitrificación en el suelo (Zumft y col., 1997; Janda y col., 1998).

De forma adicional, se intentó amplificar otro marcador molecular de la vía de la desnitrificación: el gen *nirS*. De las 4 colonias analizadas previamente, dos de ellas (ambas de la rizósfera) no amplificaron el marcador molecular mientras que las otras dos sí dieron positivas para el gen *nirS*. Estas muestras fueron secuenciadas y analizadas filogenéticamente (Figura 17). De acuerdo a este análisis se estableció que pertenecen a los microorganismos desnitrificadores dentro de la subclase γ de las proteobacterias. Esto concuerda con los resultados obtenidos con los genes *nosZ* y 16S ribosomal, donde ambas muestras se asociaron de manera cercana con el género *Pseudomonas*. Sin embargo, la secuencia obtenida para *nirS* fue bastante disímil con las secuencias de desnitrificadores típicos disponibles en la base de datos, lo que sugiere que en estos hábitat hay una diversidad genética no explorada lo que hace necesario continuar con estos esfuerzos. En especial cuando los resultados obtenidos por Cavigelli y col. (2001) apoyan la hipótesis que la composición del gremio de los desnitrificadores estaría influenciando la producción de N_2O en suelos, por lo que estudios sobre la diversidad de estos grupos microbianos y su función podrían ayudar a controlar las emisiones de este gas de efecto invernadero.

CONCLUSIONES

- ❖ Los resultados indican que en los ecosistemas semiáridos estudiados están presentes los principales grupos funcionales del ciclo del nitrógeno:
 - Los clones de BFN del suelo sin cobertura se relacionan mayoritariamente con bacterias del género *Azospirillum*. Los de rizósfera, además, se relacionan con bacterias rizobiales.
 - Los clones de nitrificadores se relacionan con el género *Nitrosomonas* y con el género *Nitrospira*, ambos oxidadores de amonio.
 - Los desnitrificadores obtenidos mediante cultivo se relacionan principalmente con los géneros *Ralstonia* y *Pseudomonas*.
- ❖ Tanto los clones obtenidos como las colonias aisladas en este trabajo se relacionan con bacterias no cultivadas, lo que podría indicar que en estos suelos hay una fuente de nuevos recursos genéticos.

REFERENCIAS

- Allan, D. y P. Graham.** 2002. Soil 5611: Soil Biology and Fertility: Symbiotic Nitrogen Fixation, other N₂-fixing symbiosis. Dep. of Soil, Water, and Climate. University of Minnesota.
Disponible en:
<http://www.soils.umn.edu/academics/classes/soil2125/doc/s9chap2.htm>
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.
- Atlas, R. M. y R. Bartha.** 2001. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Cuarta edición. Addison Wesley. Madrid.
- Baldani, J. L., L. Caruso, V.L.D. Baldani, S.R. Goi y J. Döbereiner.** 1997. Recent advances in BNF with non-legumes plants. *Soil Biol. Biochem.* **29**:911-922.
- Bashan, Y. y H. Levanony.** 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* **36**: 591- 608.
- Bashan, Y.** 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.*, **16**: 729-770.
- Benson, D.R. Y W.B. Silvester.** 1993. Biology of Frankia Strains, Actinomycete Symbionts of Actinorhizal Plants. *Microbiol. Rev.* **57**: p. 293-319.
- Berkum, P.V. y B.B. Bohlool.** 1980. Evaluation of Nitrogen Fixation by Bacteria in Association with Roots of Tropical Grasses. *Microbiol. Rev.* **44**: 491-517.
- Braker, G., A. Fesefeldt y K.P. Witzel.** 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3769-3775.
- Braker, G., J. Zhou, L. Wu, A.H. Devol y J.M. Tiedje.** 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2096-2104.
- Bruns, M.A., J.R. Stephen, G.A. Kowalchuk, J.I. Prosser y E.A. Paul.** 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rDNA gene sequences in native, tilled and sucesional soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2994-3000.
- Cavigelli, M.A. y G.P. Robertson.** 2001. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 297-310.

- Chávez, M.** 2004. Diversidad genética de las poblaciones de *Frankia* y bacterias fijadoras de nitrógeno en la rizósfera de *Colletia hystrix*. Tesis de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 145 pp.
- Chávez, M. y M. Carú.** 2006. Genetic diversity of *Frankia* microsymbionts in root nodules from *Colletia hystrix* (Clos.) plants by sampling at a small-scale. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 813- 820.
- Chèneby, D., L. Philippot, A. Hartmann, C. Henault y J.C. Germon.** 2000. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**: 121-128.
- De Coninck, K., S. Horemans, S. Randoz y K. Vlassak.** 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. *Plant Soil* **110**: 213-218.
- Dijkhuizen, L. y W. Harder.** 1979. Regulation of autotrophic and heterotrophic metabolism in *Pseudomonas oxalaticus* OX1: Growth on mixtures of oxalate and formate in continuous culture. *Arch. Microbiol.* **123**: 55-63.
- Dreyfus, B.L., C. Elmerich y Y.R. Dommergues.** 1983. Free-Living Rhizobium Strain able To Grow on N₂ as the Sole Nitrogen Source. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 711-713.
- Ferguson, S.J.** 1998. Nitrogen cycle enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**:182-93.
- Furlong, M.A., D.R. Singleton, D.C. Coleman y W.B. Whitman.** 2002. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1265-1279.
- García, J.G., V. Moreno, I. Rodríguez, A. Mendoza y N. Mayek.** 2007. Effect of *Azospirillum brasilense* strains on maize growth and grain yield. *Rev. Fitotec. Mex.* **30**: 305- 310.
- Glick B.R.** 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**, 109-117.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- Head, I.M., W.D. Hiorns, T.M. Embley, A.J. McCarthy y J.R. Saunders.** 1993. The phylogeny of autotrophic ammonium-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1147-1153.
- Henry, S.D. Bru, B. Stress, S. Hallet y L. Philippot.** 2006. Quantitative Detection of the *nosZ* Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and

- Comparison of the Abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* Genes in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5181–5189.
- Heylen, K., B. Vanparys, L. Wittebolle, W. Verstraete, N. Boon y P. De Vos.** 2006. Cultivation of Denitrifying Bacteria: Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2637–2643
- Holtan-Hartwig, L., P. Dörsch y L.R. Bakken.** 2000. Comparison of denitrifying communities in organic soils: kinetics of NO₃ and N₂O reduction. *Soil Biol. Biochem.* **32**:833–843.
- Hussein Zahran, H.** 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microb. and Molec. Biol. Rev.* **63**: 968-989.
- IPCC.** Climate change, the scientific basis. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Janda, V., J. Rudovsky, J. Wanner y K. Marha.** 1998. In situ denitrification of drinking water. *Water Sci. Technol.* **20**: 215-219.
- Jukes, T.H. y Cantor, C.R.** 1969. Evolution of protein molecules. Pp. 21-123 in H. N. Munro, ed. *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York.
- Kent, A.D. y E.W. Triplett.** 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 211- 236.
- Kirshtein, J.D., H.W. Paerl y J. Zehr.** 1991. Amplification, cloning, and sequencing of a *nifH* Segment from aquatic microorganisms and natural communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2645-2650.
- Knowles, R.** 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**: 43-70.
- Kordel, W., M. Dassenakis, J. Lintlemann y S. Padberg.** 1997. The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils. *PAC.* **69**: 1571-1600.
- Kowalchuk, G.A. y J.R. Stephen.** 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1489- 1497.
- Kowalchuk, G.A. y J.R. Stephen.** 2001. Ammonia- oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 485-529.
- Liesack, W., P.H. Janssen, F.A. Rainey, N.L. Ward-Rainey y E. Stackenbrandt.** 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques, p. 375–439. *In* J. D. van Elsas, J. T. revors, and E. M. H. Wellington (ed.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York, N.Y.

- Lim, Y.W., S.A. Lee, S. B. Kim, H.Y. Yong, S.H. Yeon, Y.K. Park, D.W. Jeong y J.S. Park. 2005. Diversity of Denitrifying Bacteria Isolated from Daejeon Sewage Treatment Plant. *The Journal of Microbiol.* **43**: 383-390.
- Mahmood, S., T.E. Freitag y J. L. Prosser. 2006. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples. *FEMS Microbiology Ecology.* **56**: 484-493.
- McCaig, A.E., T.M. Embley y J.L. Prosser. 1994. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidizers. *FEMS Microbiol Lett* **120**: 363-368.
- Mergel, A., O. Schmitz, T. Mallmann y H. Bothe. 2001. Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **36**, 33-42
- Michotey, V., V. Méjean y P. Bonin. 2000. Comparison of Methods for Quantification of Cytochrome cd1-Denitrifying Bacteria in Environmental Marine Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1564-1571
- Mogabe, J. 1994. Research on Biofertilizers: Kenya, Zimbabwe and Tanzania. *Biotechnology and Development Monitor.* **18**: 9-10.
- Nold, S.C., J. Zhou, A. H. Devol y J. M. Tiedje. 2000. Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the β subdivision of the proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4532-4535.
- Ollinger, S.V., J.D. Aber, G. M. Lovett, S.E. Millham, R. G. Lathrop y J.M. Ellis. 1993. A spatial model of atmospheric deposition for the northeastern US. *Ecol. Appl.* **3**: 459-472.
- Orlando, J., M. Chávez, L. Bravo, R. Guevara y M. Carú. 2007. Effect of *Colletia hystrix* (Clos), a pioneer actinorhizal plant from the Chilean matorral, on the genetic and potential metabolic diversity of the soil bacterial community. *Soil Biology & Biochem.* **39**: 2769- 2776.
- Poly, F., L. Ranjard, S. Nazaret, F. Gourbière y L.J. Monrozier. 2001. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2255- 2262.
- Prosser, JI. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **30**:125- 81
- Puente, M. y A. Peticari. 2006. Promotores del crecimiento vegetal. Características y uso potencial en el agro argentino. *Revista de los CREA.* **304**: 66-69.
- Purkhold, U., A. Pommerening- Röser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H-P. Koops y M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis:

- Implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5368-5382.
- Rosado, A.S., G.F. Duarte, L. Seldin y J.D. van Elsas.** 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. *Rev. Microbiol.* **28**: 135-147.
- Rösch, C., A. Mergel y H. Bothe.** 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3818-3829.
- Rotthauwe, J.H., K.P. Witzel y W. Liesack.** 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4704-4712.
- Schinner, F., R. Öhlinger, E. Kandeler y R. Margesin.** 1996. *Methods in Soil Biology.* Springer -Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Schwencke, J. y M. Caru.** 2001. Advances in actinorhizal symbiosis: Host plant-*Frankia* interactions, biology, and application in arid land reclamation. A review. *Arid Land Res. Manag.* **15**:285-327.
- Silvester, W.B., O. Balboa y J.A. Martínez.** 1985. Nodulation and nitrogen fixation in members of the Rhamnaceae (*Colletia*, *Retanilla*, *Talguenea*, *Trevoa*) growing in the chilean matorral. *Symbiosis* **1**: 29-38.
- Sinigalliano, C.D., D.N. Khun y R.D. Jones.** 1995. Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2702-2706.
- Smit, E., P. Leeflang, S. Gommans, J. Van den Broek, S. Van Mil y K. Wernars.** 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2284-2291.
- Steenwerth, K.L., L.E. Jackson, F.J. Calderón, M.R. Stromberg y K.M. Scow.** 2003. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of Coastal California. *Soil Biology and Biochemistry* **35**:489-500.
- Stephen, J.R., A.E. McCaig, Z. Smith, J.L. Prosser y T.M. Embley.** 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4147-4154.
- Stevenson, B.S., S.A. Eichorst, J.T. Wertz, T.M. Schmidt y J.A. Breznak.** 2004. New Strategies for Cultivation and Detection of Previously Uncultured Microbes. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4748-4755.

- Stres, B., I. Mahne, G. Avgustin y J.M. Tiedje. 2004. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:301-309.
- Throbäck, I.N., K. Enwall, A. Jarvis y S. Hallin. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microb. Ecol.* **49**: 401- 417.
- Tiedje, J.M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonia, p. 179-244. In A. J. B. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*. Wiley, New York.
- Van de Peer, Y. y R. De Wachter. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Applic Biosci* **10**:569-570.
- Vandenhove, H., R. Merckx, M. Steenbergen y K. Vlassak. 1993. Microcalorimetric characterization, physiological stages and survival ability of *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 513- 519.
- Voytek, M.A. y B.B. Ward. 1995. Detection of ammonium- oxidizing bacteria of the beta subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1444-1450.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier y D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**: 697-703.
- Widmer, F., B.T. Shaffer, L.A. Porteous y R. J. Seidler. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 374- 380.
- Wood, D.W., J.C. Setubal, R. Kaul, D. Monks, L. Chen, G.E. Wood, Y. Chen, L. Woo, J.P. Kitajima, V.K. Okura, N.F. Almeida, Y. Zhou, D. Bovee, P. Chapman, J. Clendenning, G. Deatherage, W. Gillet, C. Grant, D. Guenther, T. Kutayavin, R. Levy, M. Li, E. McClelland, A. Palmieri, C. Raymond, G. Rouse, C. Saenphimmachak, Z. Wu, D. Gordon, J.A. Eisen, I. Paulsen, P. Karp, P. Romero, S. Zhang, H. Yoo, Y. Tao, P. Biddle, M. Jung, W. Krespan, M. Perry, B. Gordon-Kamm, L. Liao, S. Kim, C. Hendrick, Z. Zhao, M. Dolan, S.V. Tingey, J. Tomb, M.P. Gordon, M.V. Olson y E.W. Nester. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**:2317-2323.
- Yeager, C.M., D.E. Northup, C.C. Grow, S.M. Barns y C.R. Kuske. 2005. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2713-2722.
- Young, J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, p. 43-86. In G. Stacy, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall, New York, N.Y.

- Zehr, J.P., B.D. Jenkins, S.M. Short y G.F. Steward.** 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* **5**: 539 – 554.
- Zhou, J., M. Bruns y J.M. Tiedje.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 316-322.
- Zumft, W.G.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 533-616.