

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y FÍSICO – QUÍMICOS ASOCIADOS
AL METABOLISMO EDÁFICO DEL NITRÓGENO EN CULTIVOS DE *Solanum phureja* EN
EL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA**

NATHALIA MARIA VANESSA FLÓREZ ZAPATA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS – MICROBIOLOGÍA
SEDE BOGOTÁ
2010

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y FÍSICO – QUÍMICOS ASOCIADOS
AL METABOLISMO EDÁFICO DEL NITRÓGENO EN CULTIVOS DE *Solanum phureja* EN
EL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA**

NATHALIA MARIA VANESSA FLÓREZ ZAPATA
Cod. 01186308

Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencias -
Microbiología

Director:
DANIEL URIBE VÉLEZ PhD.
Profesor Asociado Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS – MICROBIOLOGÍA
SEDE BOGOTÁ
2010

NOTA DE ACEPTACIÓN

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el día 04 de agosto de 2010.

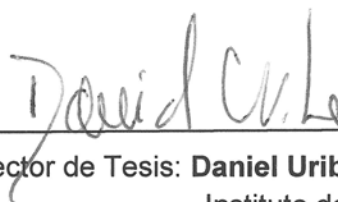
En constancia firman:



Jurado: **Silvia Restrepo**, Ph.D.
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias
Universidad de los Andes



Jurado: **Pedro Filipe de Brito Brandão**, Ph.D.
Departamento de Química
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia



Director de Tesis: **Daniel Uribe Vélez**, Ph.D.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia

*A todos aquellos que con su amor y comprensión me acompañaron
en esta etapa de mi vida*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la sabiduría de encontrar una profesión que me apasiona y la fortaleza para culminar esta etapa de mi vida.

A mi familia por su amor y compañía.

A Felipe porque es la inspiración, el motivo y el facilitador de esta etapa de mi vida, pero sobre todo por su infinito amor.

Al profesor Daniel Uribe, quien no sólo me ha ayudado a formarme en el plano académico, sino que cada día me brindó lecciones importantes que me hicieron crecer en cada etapa de este proceso.

A la profesora Martha Fontanilla y demás profesores que compartieron su conocimiento y contribuyeron a mi formación.

A los Investigadores que hacen parte del Consorcio de Investigación en Metagenómica de Suelos Agrícolas (CIMA), por facilitar el acceso a la información y propiciar el espacio para la discusión académica que sin duda enriqueció mi formación y el presente trabajo.

A María Magdalena y el PhD. Fabio Roldán, quienes amablemente compartieron sus conocimientos en el estudio de comunidades nitrificantes por el método de número más probable.

Al personal administrativo del Instituto de Biotecnología, en especial a Socorrito, Herlinda, Yolanda y Rocío, porque su labor contribuyó a que esta etapa pudiera llegar a feliz término.

A mis compañeros de laboratorio, los pasantes de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y mis compañeros de clases, porque cuando fue necesario se ofrecieron a ayudarme en momentos en que la cantidad de trabajo me abrumaba.

A las entidades financiadoras, Centro Nacional de investigaciones de Café (CENICAFÉ) y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y FÍSICO – QUÍMICOS ASOCIADOS AL METABOLISMO EDÁFICO DEL NITRÓGENO EN CULTIVOS DE *Solanum phureja* EN EL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA

Resumen

Una gran diversidad de microorganismos, regulan la transformación del nitrógeno en el suelo, afectando la disponibilidad del mismo para la planta en los sistemas agrícolas. Por tanto, en este estudio se evaluó la abundancia de dichos grupos asociados al ciclo del nitrógeno por aproximaciones tanto dependientes como independientes de cultivo, en muestras de suelo rizosférico de cultivos de papa criolla (*Solanum phureja*) con manejo agrícola contrastante. Asimismo, se estableció la relación entre su abundancia, con otros descriptores físico – químicos, bioquímicos y agronómicos de los suelos de estudio.

Los resultados del análisis de las características físico – químicas permitieron agrupar los suelos en función del manejo agrícola, mientras que la abundancia de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno analizados por técnicas dependientes de cultivo, a pesar de mostrar diferencias significativas entre suelos, no los agrupo en relación con esta característica. Se observó que el contenido de materia orgánica parece tener un papel fundamental en el ciclaje del nitrógeno en los suelos de estudio, ya que los microorganismos relacionados con la mineralización de nitrógeno orgánico presentaron las mayores abundancias, así como relaciones con productividad y variables físico - químicas de mineralización, tales como carbón orgánico, pH, humedad, CIC y nitrógeno total. No se observó relación entre las actividades enzimáticas del suelo y la abundancia de los microorganismos cultivables que desempeñan dicha función en el ecosistema; sin embargo la actividad nitrogenasa y la proporción de fijadores de nitrógeno estimada por técnicas independientes de cultivo, si presentó dicha correlación. Al analizar las poblaciones por técnicas independientes de cultivo, la proporción de los microorganismos a nivel de *phylum*, no presenta un patrón característico en relación con el manejo agrícola; no obstante, la población potencial relacionada con los procesos de oxidación de nitrito, fijación de nitrógeno y denitrificación, presentó mayores proporciones para las fincas de manejo orgánico, lo cual no se relaciona con las observaciones preliminares por técnicas dependientes de cultivo. Además, al comparar la asignación taxonómica de los organismos asociados al proceso de fijación de nitrógeno, mediante las dos metodologías de análisis no se observa correspondencia. Finalmente, al realizar un análisis de agrupamiento de las fincas en función de la proporción potencial de grupos funcionales del ciclo del nitrógeno analizados por técnicas independientes de cultivo, se observó una distribución similar a la obtenida cuando se realizó el análisis con las variables físico – químicas.

En conclusión, se resalta como la mirada holística de grupos funcionales de microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno, permiten identificar puntos clave del ciclaje de este elemento, haciendo viable su utilización como indicadores del estatus nutricional del suelo. En relación al metabolismo del nitrógeno, la mineralización del nitrógeno orgánico parece ser un proceso fundamental en los suelos de estudio. Además, las prácticas de manejo agrícola al parecer influyen sobre algunos grupos asociados con el ciclaje de este elemento, posiblemente por los efectos que estos acarrearán sobre las propiedades físico – químicas del suelo.

Palabras Claves: Nitrógeno orgánico, mineralización, pirosecuenciación, recuento de microorganismos cultivables, manejo agrícola.

BIOLOGICAL AND PHYSICO CHEMICAL PARAMETERS RELATED TO EDAFIC NITROGEN METABOLISM IN *Solanum phureja* CROPS IN CUNDINAMARCA

Abstract

A great diversity of soil microorganisms regulates the soil nitrogen transformations, and affects the availability of this nutrient for the plant in the agricultural systems. This study evaluated these microorganisms by culture dependent and independent approaches in seven soil rhizosferic samples of two contrasting farming managements of *Solanum phureja* crops. The relationship between the microorganisms abundance and other physicochemical descriptors was also established.

The analysis of soil physicochemical features allowed grouped together the soils according to the agricultural management type; and, despite the abundance of functional groups of the nitrogen cycle analyzed presented significant differences among soils, these variables was not grouped the according to this characteristic. Additionally, it was observed that organic matter content appears to have an important role in the nitrogen cycling, because microorganisms associated with organic nitrogen mineralization, showed the highest abundance, and relationships with productivity and physicochemical variables, such as organic carbon, pH, moisture, CIC and total nitrogen.

Although the relationship between soil enzyme activities and the abundance of the specific microbial group related to this nitrogen cycle process was not found, the correlation of nitrogenase activity and the ribotypes proportion of nitrogen fixers were observed. On the other hand, the proportion of microorganisms ribotypes at the phylum level of does not support a special pattern respect to agricultural management; but ribotypes related to nitrite oxidation, nitrogen fixation and denitrification, reported higher proportions in the organically managed farms, which is not linked with preliminary observations of these populations with most probable counts. Moreover, comparing the taxonomic assignment for nitrogen-fixing microorganisms, obtained in the two different approaches (culturable counts and pyrosequencing), not good correspondence was observed. Finally, a hierarchical clustering analysis with the cumulative proportion of ribotypes associated with the different nitrogen cycle process evaluated, grouped the soils in a similar way that the physicochemical analysis done.

As conclusion, it is highlighted that a comprehensive analysis of nitrogen cycle functional groups allows to identify fundamental points of this process, making feasible the use of these populations as indicators of soil nutritional. Regarding to nitrogen metabolism, mineralization of organic nitrogen appears to be an important process in analyzed soils. In addition, agricultural management practices affect some groups relate with the nitrogen cycle, likely for the effects that these carry on the physicochemical properties of soil.

Key words: Organic nitrogen, mineralization, pyrosequencing, counting of culturable microorganisms, agricultural management.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. MARCO CONCEPTUAL.....	14
2.1 El cultivo de papa.....	14
2.2 El suelo como un hábitat de comunidades microbianas.....	16
2.3 El nitrógeno: transformaciones ambientales y comunidades microbianas asociadas al ciclaje de dicho elemento.....	19
2.3.1 Mineralización de nitrógeno orgánico.	20
2.3.2 Fijación Biológica de Nitrógeno.....	22
2.3.3 Nitrificación.....	23
2.3.4 Denitrificación.....	25
2.3.5 Reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA).....	27
2.3.6 Asimilación de nitrógeno.	28
2.3.7 Pérdida de formas nitrogenadas del suelo.....	29
2.3.7 Consideraciones finales del metabolismo edáfico del nitrógeno.	30
2.4 Aproximaciones metodológicas para el estudio de comunidades microbianas del suelo.....	31
2.4.1 Aproximaciones dependientes de cultivo.....	32
2.4.2 Aproximaciones independientes de cultivo.....	33
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
4. JUSTIFICACIÓN.....	38
5. HIPÓTESIS.....	41
6. OBJETIVOS.....	42
6.1 Objetivo General	42
6.2 Objetivos Específicos.....	42
7. MATERIALES Y MÉTODOS	43
7.1 Sitio y recolección de las muestras.....	43

7.2 Caracterización físico – química	43
7.3 Determinación de la actividad proteasa y nitrogenasa en las muestras de suelo.	44
7.4 Estimación de la abundancia de grupos funcionales de microorganismos cultivables asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno.	45
7.5 Amplificación y secuenciación del gen 16s rRNA de organismos fijadores de nitrógeno aislados del recuento en placa	46
7.6 Extracción de ácidos nucleicos, amplificación y secuenciación del 16s rRNA de la comunidad.	47
7.7 Análisis y Limpieza de Secuencias obtenidas mediante pirosecuenciación.....	48
7.8 Asignación funcional de los ribotipos, asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno. ..	49
7.9 Análisis estadístico	49
8. RESULTADOS	51
8.1Propiedades físico-químicas de los suelos de estudio	51
8.2 Estimación de la abundancia de grupos funcionales de microorganismos cultivables asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno y su relación con algunas propiedades físico-químicas del suelo.	53
8.3 Determinación de las actividades enzimáticas	57
8.4 Análisis de secuencias del gen 16s rRNA (ribotipaje).	59
8.5 Asignación funcional de los ribotipos, asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno. ..	62
9. DISCUSIÓN	74
10. CONCLUSIONES	90
11. RECOMENDACIONES.....	92
ANEXOS	92
REFERENCIAS	95

TABLA DE TABLAS

Tabla 1. Análisis físico – químico de los suelos de estudio.	51
Tabla 2. Número más probable de algunos microorganismos asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno..	56
Tabla 3. Características generales del conjunto de datos de las muestras analizadas por pirosecuenciación.	60
Tabla 4. Asignación taxonómica de los ribotipos a nivel de phylum. Los datos presentados corresponden a la proporción de cada phylum o dominio, en relación con las secuencias de buena calidad obtenidas para cada finca..	62
Tabla 5. Asignación taxonómica de los organismos fijadores de nitrógeno aislados de Agar NFB.....	68
Tabla 6. Resumen de diferentes variables asociadas al proceso de fijación biológica de nitrógeno.....	71
Tabla 7. Relación entre la estimación de los grupos funcionales obtenidos mediante la aproximación dependiente e independiente de cultivo.....	72

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del nitrógeno en el suelo.....	20
Figura 2. Aproximaciones metodológicas para el estudio de comunidades edáficas.....	32
Figura 3. Metodología de pirosecuenciación.	35
Figura 4. Análisis jerárquico de clusters para los suelos de estudio, en relación a las variables físico-químicas evaluadas.....	52
Figura 5. Recuento de total de bacterias en Agar Nutritivo.	53
Figura 6. Recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno en Agar NFB.	55
Figura 7. Actividad Proteasa.....	57
Figura 8. Actividad Nitrogenasa.....	58
Figura 9. Análisis de componentes principales.....	59
Figura 10. Proporción de ribotipos asociados al proceso de oxidación de amonio.	63
Figura 11. Proporción de ribotipos asociados al proceso de oxidación de nitrito.	64
Figura 12. Proporción de ribotipos asociados al proceso de denitrificación.	65
Figura 13. Proporción de ribotipos asociados al proceso de reducción desasimilativa de nitrato a amonio.	66
Figura 14. Proporción de ribotipos asociados al proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno...	67
Figura 15. Géneros Fijadores de Nitrógeno Asignados Finca 1..	69
Figura 16. Géneros Fijadores de Nitrógeno Asignados Finca 4.	69
Figura 17. Géneros Fijadores de Nitrógeno Asignados Finca 6.	70
Figura 18. Géneros Fijadores de Nitrógeno Asignados Finca 7	70
Figura 19. Análisis jerárquico de clusters para los suelos de estudio, en relación a las proporciones de ribotipos asociados a los diferentes procesos del ciclo del nitrógeno.....	73

1. INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo, se discuten los resultados del análisis de las comunidades microbianas del suelo que median las transformaciones del nitrógeno, con el propósito de acercarse al entendimiento de la dinámica de este nutriente, bajo las características propias del ecosistema donde es cultivada la papa criolla (*Solanum phureja*). Para llevar a cabo dicho propósito, suelo rizosférico de cultivos de papa criolla en estado de floración, con manejo agrícola tradicional (donde hay aplicación de productos químicos para la fertilización y control de plagas del cultivo) y manejo orgánico (donde la nutrición del cultivo es mejorada a través de la adición de enmiendas orgánicas), fueron analizados. En primer lugar se determinaron las propiedades físico – químicas de dichos suelos, observándose diferencias importantes entre otras, en aquellas relacionadas con el contenido de formas de nitrógeno en el suelo (nitrógeno total, nitrato y amonio). Al realizar un análisis multivariado de agrupamiento, se obtuvo una agrupación de los resultados de dichas propiedades en los suelos en función del manejo agrícola.

La estimación de microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno, se realizó desde dos perspectivas. En la primera, los diferentes grupos funcionales de microorganismos que intervienen en el ciclo del nitrógeno fueron enumerados gracias a su capacidad de desarrollarse en un medio de cultivo; mientras que en la segunda, se consideró la afiliación taxonómica del individuo y el conocimiento previo de los géneros involucrados en diferentes procesos del ciclo, para establecer la representación porcentual de dichas comunidades, que potencialmente podrían desempeñar dicha función en el ecosistema, a partir de los ribotipos generados mediante una aproximación de pirosecuenciación las regiones variables V5 y V6 del gen 16s rRNA de la comunidad total.

Adicionalmente, con el propósito de establecer como dichas poblaciones se ven afectadas por las propiedades físico – químicas del suelo, se realizaron análisis de correlación entre la abundancia de cada grupo de microorganismos y dichas variables. Como resultado obtuvimos, que muchos de estos grupos presentaban relaciones con las características del suelo,

generando especial atención los microorganismos proteolíticos, que fueron los únicos que presentaron una relación positiva con la productividad del cultivo, y con variables tradicionalmente asociadas a procesos de mineralización de materia orgánica, en este caso de nitrógeno orgánico, sugiriendo un rol importante de dicha forma de nitrógeno en los suelos estudiados.

Al contrastar los resultados de abundancia (recuento) o proporción (porcentaje de ribotipos) de microorganismos asociados con el ciclo de este nutriente, se encontró poca correspondencia entre los resultados. Además, al analizar la identidad taxonómica de organismos fijadores de nitrógeno aislados en un medio de cultivo selectivo, respecto a los organismos que potencialmente desempeñan dicha función en el ecosistema, asignados mediante una aproximación independiente de cultivo, no se encontró correspondencia, lo cual sugiere un sesgo en el medio de cultivo que no refleja precisamente a los organismos más abundantes. Las actividades enzimáticas (proteasa y nitrogenasa) fueron analizadas como indicadores de la “función”, en los suelos de estudio, aunque en relación con la estimación de los microorganismos proteolíticos y fijadores de nitrógeno cultivables, no mostraron relación. Sin embargo la actividad nitrogenasa si presentó una tendencia similar a la establecida en términos de la proporción de microorganismos que potencialmente desempeñan esta función en el ecosistema.

Este trabajo presenta entonces, un esfuerzo en entender el ciclo del nitrógeno a través de una mirada holística, que integra diferentes descriptores del suelo, tales como la abundancia de microorganismos, las propiedades físico – químicas, actividades enzimáticas y variables agronómicas como fertilización y producción; generando información importante acerca de la dinámica de este nutriente en el suelo y la ecología de las poblaciones relacionadas con las transformaciones de este. Se constituye además, en un punto de partida para la formulación de enmiendas o prácticas de manejo, que potencialicen las actividades microbianas que proporcionan fuentes asimilables del nitrógeno a la planta, dando respuesta a la problemática de fertilización del cultivo de la papa, así como al reto académico que representa el entendimiento del ciclaje de este elemento en diferentes ecosistemas, gracias a su importancia en el sostenimiento de la calidad ambiental.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1 El cultivo de papa

En Colombia, la papa es un cultivo de carácter transitorio del que se obtienen dos cosechas al año, siendo las condiciones climáticas, especialmente lluvias y heladas las que determinan las épocas de siembra. Cabe resaltar, que los cultivos de papa se encuentran localizados principalmente en climas fríos con temperaturas de 13°C y alturas de 2.000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), hasta alcanzar zonas de páramo con alturas cercanas a los 3.500 m.s.n.m. y temperaturas de 8°C (Espinal *et al.*, 2005). Así, según el Censo Nacional del Cultivo de la Papa en Cundinamarca el 94% del área sembrada se encuentra entre los 2.500 y 3.500 m.s.n.m (DANE, 2002).

Los suelos donde se cultiva la papa, son suelos ándicos, que por sus orígenes volcánicos, se caracterizan por un contenido de materia orgánica que varía de medio a alto, densidades aparentes bajas y texturas francas a arcillosas, con presencia de arcillas amorfas; además, presentan una alta retención de agua y son altamente fijadores de fosfatos (Palacios *et al.*, 2008; Castro, 2005). Se destaca, que el mejor suelo para el desarrollo de este cultivo, es el de textura franca, con buen drenaje, pH entre 5.2 y 5.9 y buenos niveles de materia orgánica (Mosquera, 2003).

Dentro de los elementos más importantes en el cultivo de la papa se destacan el nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio. Estos elementos, son aplicados al cultivo principalmente en forma de fertilizantes NPK compuestos, de los cuales predominan aquellos con altos contenidos en fósforo en relaciones tales como 1:3:1, 2:4:1 y en menor escala la relación 1:2:2 (Barrera, 1995). En general, se ha observado que el cultivo de papa responde favorablemente a la fertilización, a mayor rendimiento, mayor requerimiento nutricional (Villamil, 2005); sin embargo, es importante anotar que el incremento en consumo de fertilizantes es muy superior a la productividad (Ruiz, 2005).

Por lo anterior, en los últimos años, se han propuesto varios trabajos que evalúan la respuesta del cultivo en términos de productividad en relación con la aplicación de diferentes dosis de macro y micronutrientes, con el propósito de contribuir a la optimización de la fertilización para dicho cultivo (Pérez *et al*, 2008; Becerra *et al.*, 2007). Además, se han propuesto estudios que determinan el efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas solas o combinadas con diferentes dosis de fertilizantes minerales sobre la productividad del cultivo (Muñoz & Lucero, 2008). Sin embargo, los resultados parecen ser específicos de cada variedad de papa analizada y de las condiciones propias del suelo de estudio.

Adicionalmente, algunos productores de papa han intentado suplir las necesidades nutricionales del cultivo, a través de la implementación de un manejo agronómico orgánico, sin embargo, no se encuentra información clara al respecto, por lo que la aplicación de dicho manejo se limita a experiencias particulares. Aunque en general, este tipo de manejo agrícola se caracteriza porque busca la disminución o no utilización de fertilizantes químicos o cualquier producto de origen sintético; reemplazándolos por abonos y enmiendas orgánicas como la gallinaza, bocashi, residuos de cosechas, entre otros productos renovables. Además, pretende gestionar interacciones y procesos biológicos y ecológicos, que permitan mantener la productividad del cultivo y disminuir la incidencia de plagas y enfermedades, apoyándose entre otras cosas, en prácticas como la rotación de cultivos (Rigby & Cáceres, 2001).

De lo anterior, podemos resaltar entonces como la nutrición del cultivo de la papa es un punto clave que puede determinar la productividad del mismo, hasta el punto que se reconoce que el uso excesivo de fertilizantes, como consecuencia de una asistencia técnica insuficiente, sumado a otros factores como la falta de tecnología e infraestructura para el manejo eficiente del agua y los sistemas de riego, han sido asociados con la disminución en la rentabilidad del mismo (Espinal *et al.*, 2005). Por lo cual, aunque se han realizado estudios encaminados a determinar el esquema de fertilización del cultivo más eficiente (Pérez *et al*, 2008; Becerra *et al.*, 2007; Muñoz & Lucero, 2008), aún existe la necesidad de comprender detalladamente los procesos que median la disponibilidad de dichos elementos para la planta, donde además se incorpore una mirada a las comunidades microbianas del suelo asociadas al ciclaje de los nutrientes, en las condiciones particulares del cultivo de papa, ya que desde hace varios años,

se ha determinado que estos organismos son fundamentales para el sostenimiento y fertilidad de los ecosistemas agrícolas (Barrios, 2007).

2.2 El suelo como un hábitat de comunidades microbianas

El suelo es un sistema biológico complejo y dinámico, que sirve como microhabitat a una gran número de comunidades microbianas que intervienen en un amplio rango de servicios del ecosistema que son esenciales para el funcionamiento del mismo (Barrios, 2007; Nannipieri *et al.*, 2003), tales como el ciclaje de nutrientes, la degradación de compuestos tóxicos, la supresión natural de patógenos y la modificación de la estructura del suelo, entre otros (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007).

Entonces, cabe resaltar algunas propiedades que hacen que el suelo sea tan complejo y pueda sustentar una amplia diversidad de microorganismos. En primer lugar, gracias a su estructura, este ofrece diferentes condiciones para la actividad de los microorganismos tales como interfases sólido-líquido, sólido gas y líquido-gas; lo cual permite la definición de una gama amplia de micronichos. Por lo anterior, la actividad de los microorganismos en el suelo se ha de concebir con la presencia simultánea y variable tanto en el espacio como en el tiempo de diversos micronichos. De esta manera, se explica la ocurrencia concomitante de procesos mutuamente excluyentes, en teoría, tales como la nitrificación – que requiere de condiciones aeróbicas y la denitrificación – que requiere condiciones anaeróbicas (Ramírez, 1996).

Además, a pesar de ser un ambiente pobre en nutrientes y fuentes de energía, su estructura permite el desarrollo de “hot spots” de actividad microbiana, como la rizósfera; esta, es definida como el volumen de suelo adyacente e influenciado por las raíces de las plantas (Smalla *et al.*, 2001); siendo los exudados radicales, los que principalmente influyen las comunidades microbianas del suelo, ya que estos suministran compuestos orgánicos y otros elementos que pueden afectar positiva o negativamente la actividad microbiana del medio edáfico. Los tipos de exudados que frecuentemente se encuentran son: carbohidratos del tipo de los monosacáridos, di, tri y oligosacáridos; factores del crecimiento como la tiamina, niacina, colina, inositol, piridoxina, ácido N-metil nicotínico; aminoácidos y ácidos grasos (Acuña *et al.*, 2006).

Adicionalmente, otros factores ambientales como el contenido de materia orgánica y la disponibilidad de fuentes de energía y otros nutrientes, la presencia de factores de crecimiento, la composición iónica, el agua disponible, la temperatura, la presión, la composición gaseosa, la radiación electromagnética, el pH, el potencial de óxido – reducción, la estructura de la superficie de las partículas de suelo, las relaciones espaciales, la genética de los microorganismos y las relaciones entre ellos; pueden afectar la ecología, actividad y dinámica de las poblaciones en el suelo (Nannipieri *et al.*, 2003).

Por tanto, la sensibilidad de estas comunidades a cambios en las condiciones ambientales del suelo, es lo que ha hecho viable su utilización como indicadores de la productividad y sustentabilidad del mismo. Sin embargo, ha sido difícil establecer la relación entre la diversidad microbiana y la funcionalidad del suelo, así como entre la estabilidad, medida en términos de resistencia (habilidad de permanecer en un estado de referencia a pesar de la perturbación), y resiliencia, que es la capacidad de la comunidad de regresar a un estado de referencia aún después de un disturbio (Nannipieri *et al.*, 2003; Potts *et al.*, 2005; Pimm, 1984).

Un factor que ha dificultado el entendimiento de dichas relaciones es la redundancia funcional de los organismos, que puede ser explicada en términos de su versatilidad metabólica, la cual asegura que un mismo microorganismo pueda intervenir en diferentes procesos ambientales, como consecuencia de su exploración por diferentes fuentes de energía y nutrientes (Nannipieri *et al.*, 2003). Además, se resalta que nuestro entendimiento del vínculo entre la diversidad microbiana y las funciones del suelo es pobre porque la diversidad no puede ser medida fácilmente, por lo que alternativamente el conocimiento actual se ha centrado en identificar el sentido funcional de grupos particulares que afectan la productividad de las plantas en un contexto agrícola (Portugal & Gómez, 1998; Nannipieri *et al.*, 2003).

Por último, es importante resaltar que en Colombia actualmente son pocos los reportes de estudio de comunidades edáficas y su relación con el manejo agrícola; aunque si es claro, que existe un gran número de proyectos y grupos de investigación encaminados al entendimiento de cómo las condiciones propias del suelo afectan la microbiota nativa total y la de algunos grupos funcionales de interés, que permitan la formulación de soluciones biotecnológicas tendientes a una agricultura mucho más eficiente y amigable con el medio ambiente.

A manera de ejemplo, vale la pena resaltar algunos esfuerzos como el de Varela *et al.* (2004) quienes determinaron si la abundancia y diversidad de grupos funcionales de bacterias

(proteolíticas y celulolíticas) podían servir como indicadores de calidad del suelo, al comparar diferentes usos de este en una zona cafetera (bosque húmedo andino, bosque de guadua, cafetal con sombrío y cafetal sin sombrío); adicionalmente, relacionaron estos atributos de los grupos funcionales con algunas características físicas y químicas del suelo. Así, encontraron una menor abundancia del grupo celulolítico en el bosque de Guadua, mientras que la del grupo proteolítico no mostró diferencias entre usos; sin embargo, ni la riqueza ni la diversidad de los dos grupos funcionales cambió entre usos del suelo. Asimismo, sólo el pH y la humedad fueron diferentes, pero no se relacionaron con la abundancia, ni riqueza de los dos grupos funcionales. Finalmente, concluyen que los resultados iniciales sugieren que la abundancia de bacterias celulolíticas podría ser considerada como un indicador de cambio de uso de suelo, pero que es necesario realizar muestreos frecuentes para determinar la dinámica de este grupo para confirmar estos resultados y evaluar otros grupos funcionales microbianos.

Por su parte, Torres *et al.* (2006) hacen un estudio de las poblaciones de bacterias implicadas en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y fósforo, con el fin de evaluar su abundancia en cultivos de cebolla (*Allium ampeloprasum*) y papa (*Solanum tuberosum*), así como también, de determinar posibles interacciones entre estos grupos, mediante técnicas de recuento de células viables en medios selectivos. Como resultados obtuvieron un mayor número de unidades formadoras de colonia (UFC) en el suelo correspondiente al cultivo de cebolla; además que las bacterias solubilizadoras de fosfato se encuentran en menor proporción que los grupos funcionales del ciclo del carbono y mantienen tamaños poblacionales similares a las bacterias fijadoras de nitrógeno, tanto en suelo rizosférico como no rizosférico. Concluyen que según los resultados, la diferencia en la proporción de microorganismos entre rizósfera y el suelo circundante puede variar por las labores de adición de fertilizantes.

En relación con el estudio de comunidades microbianas asociadas al metabolismo edáfico del nitrógeno, en la revisión bibliográfica realizada, no se encontraron reportes del estudio del metabolismo edáfico de este nutriente abordado desde el análisis de los diferentes grupos funcionales que intervienen en dichos procesos, en suelos colombianos. Por lo que una mirada holística de dichas comunidades, representa una oportunidad para contribuir al conocimiento del ciclaje de este elemento en el suelo, ya que aunque el ciclo del nitrógeno es quizás uno de los temas más estudiados en la microbiología del suelo representa un reto intelectual extremadamente interesante, principalmente como consecuencia de la gran diversidad de

compuestos que contienen nitrógeno, los cuales a su vez se encuentran en diferentes estados de oxidación, dando oportunidad a una amplia gama de transformaciones microbianas de este compuesto en el suelo (Sylvia *et al.*, 2005).

2.3 El nitrógeno: transformaciones ambientales y comunidades microbianas asociadas al ciclaje de dicho elemento.

En el suelo, las formas de nitrógeno presentes son en su respectivo orden de concentración, son el gas dinitrógeno, el nitrógeno orgánico, el amonio y el nitrato; estos son transformados a lo largo del ciclo a través de diferentes procesos que a su vez pueden ser agrupados en tres subciclos (Figura 1). Un subciclo elemental, que corresponde a la oxidación – reducción de compuestos mediante reacciones que convierten el nitrógeno y gas dinitrógeno en diferentes formas químicas. El subciclo autotrófico, que es direccionado por la toma de nitrógeno por la planta, la cual convierte compuestos inorgánicos de nitrógeno a compuestos orgánicos (constituyentes estructurales de la planta que contienen nitrógeno). Por último, el subciclo heterótrofo, que está relacionado con los procesos de descomposición conducidos principalmente por la necesidad de organismos heterótrofos de fuentes de carbono. Estos tres subciclos funcionan simultáneamente, por lo cual es lógico pensar que estos se encuentran en competencia por una o más de las formas de nitrógeno presentes, de las cuales las concentraciones de amonio y nitrato, han sido identificados como dos puntos de control importantes durante esta competencia (Sylvia *et al.*, 2005).

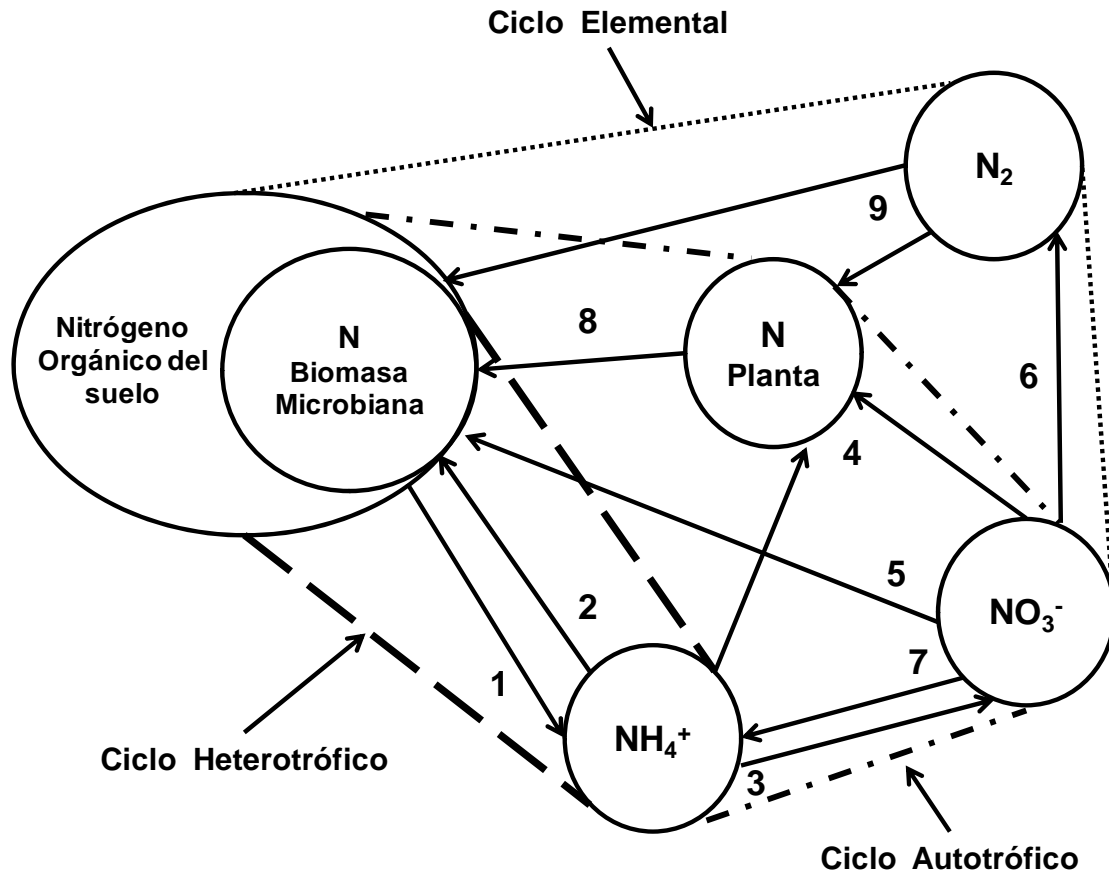


Figura 1. Ciclo del nitrógeno en el suelo. En el ciclo heterotrófico (líneas discontinuas largas), el amonio es producido y consumido por microorganismos heterótrofos. La demanda de la planta por fuentes inorgánicas de nitrógeno, permite el desarrollo del ciclo autotrófico (línea discontinua con puntos). Finalmente, la oxidación y reducción del nitrógeno por los microorganismos conduce el ciclo elemental (línea punteada). Algunas transformaciones importantes del ciclo del nitrógeno incluyen: (1) Amonificación, (2) Inmovilización, (3) Nitrificación Autotrófica, (4) Asimilación de Nitrógeno por la Planta, (5) Inmovilización de Nitrato, (6) Denitrificación, (7) Reducción Desasimilativa de Nitrato a Amonio, (8) Descomposición, (9) Fijación de Nitrógeno. Tomado de: Sylvia *et al.*, 2005.

2.3.1 Mineralización de nitrógeno orgánico.

De la materia orgánica del suelo se liberan monómeros, como aminoácidos, a partir de la producción de enzimas extracelulares, los cuales junto con otras fuentes de compuestos orgánicos lábiles, como por ejemplo exudados radicales, células microbianas muertas, productos de excreción celular, entre otros, pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de nitrógeno (Jackson *et al.*, 2008). Dentro de las enzimas extracelulares que

participan en este proceso, se destacan algunas proteasas como la subtilisina, clostripaína y termolisina; además de enzimas degradadores de pared celular como la quitinasa, quitobiosa y lisozima. Además, otras enzimas como ureasas, exonucleasas y endonucleasas, también han sido asociadas con dichos procesos de mineralización en el suelo (Sylvia *et al.*, 2005).

A través de una aproximación dependiente de cultivo, como el número más probable, Bach & Munch (2000), estimaron el número de bacterias proteolíticas en muestras de suelo tomadas a 7 niveles de profundidad en dos temporadas del año, provenientes de pastizales y bosques. Adicionalmente, determinaron la actividad proteasa de los suelos, utilizando caseína como sustrato, y variables físico – químicas del mismo. No encontraron coherencia entre los recuentos de organismos proteolíticos, la actividad proteasa y las características propias del sitio. En relación con el número de microorganismos proteolíticos, solo encontraron diferencias significativas en el número de estos microorganismos en las diferentes profundidades analizadas en las muestras provenientes de una etapa de muestreo (primavera). Con los resultados obtenidos, concluyen que las poblaciones de bacterias proteolíticas no son afectadas específicamente por condiciones del sitio, y que la dificultad de establecer una relación entre actividad proteasa y la proporción de microorganismos proteolíticos, puede ser consecuencia de que a través de una aproximación cultivable sólo una porción de la población es representada (la que es capaz de crecer bajo las condiciones evaluadas), y que la actividad proteasa puede ser consecuencia de la inmovilización de las enzimas en coloides del suelo, que no necesariamente reflejen la actividad de la población proteolítica.

Asimismo, se han desarrollado trabajos que han permitido identificar como esta función de despolimerización de nitrógeno orgánico y las comunidades microbianas asociadas a la misma, se ven afectadas por la aplicación de materia orgánica y fertilizantes inorgánicos al suelo. Por ejemplo, Sakurai *et al.*, (2007), determinaron el efecto de dichas prácticas sobre la actividad proteasa y la comunidad de organismos proteolíticos, evaluando los genes que codifican para la metaloproteasa neutra y alcalina (*npr* y *apr*, respectivamente) a través de un DGGE. Estos autores, encontraron diferencias significativas entre comunidades y tratamientos, indicando que cada tipo de bacteria proteolítica puede desempeñar un papel diferente en la comunidad. Igualmente, dado que pudieron establecer relaciones significativas entre la actividad proteolítica

y la estructura de la comunidad, concluyen que las comunidades bacterianas proteolíticas pueden jugar un papel importante en la actividad proteasa global del suelo.

Continuando con las transformaciones de nitrógeno orgánico, posterior a la acción de estas enzimas extracelulares, y una vez producidos monómeros de compuestos orgánicos, enzimas como amidasas (como por ejemplo, asparaginidasas y glutaminidasas), aminoácido dehidrogenasas y aminoácido oxidasas, son producidas por los microorganismos, para la producción de amonio a través de nitrógeno orgánico en un proceso conocido como amonificación (Sylvia *et al.*, 2005).

Recientemente, Muruganandam *et al.* (2009) determinaron el efecto de tres tipos de labranza sobre la mineralización de nitrógeno, medida a través de las actividades enzimáticas de enzimas como N – acetil glucosaminidasa, arilamidasa, L-glutaminasa, y L-asparaginasa en el suelo; en su estudio, dichos autores encontraron que todas las actividades enzimáticas fueron significativamente mayores en los suelos sin labranza y presentaban relaciones positivas con los contenidos de nitrógeno, carbono y biomasa de carbono del suelo.

2.3.2 Fijación Biológica de Nitrógeno

Es importante resaltar a este nivel que los organismos heterótrofos mineralizadores de nitrógeno orgánico, no son los únicos que liberan amonio al sistema. Los fijadores biológicos de nitrógeno, son un grupo funcional de organismos con la capacidad de tomar el nitrógeno atmosférico y convertirlo en amonio. Dicha capacidad, está determinada por la presencia en estos organismos de una enzima, llamada nitrogenasa la cual cataliza el rompimiento del triple enlace nitrógeno-nitrógeno del nitrógeno atmosférico (Sylvia *et al.*, 2005). Esta enzima comprende dos proteínas; en primer lugar un hemodímero llamado hierro proteína, importante en el transporte de electrones provenientes de la hidrólisis de ATP, los cuales son necesarios para suministrar la energía de rompimiento del triple enlace; y en segundo lugar la molibdeno hierro – proteína, la cual contiene el sitio de unión y reducción del nitrógeno; aunque existen variantes de esta última proteína en la cual el molibdeno puede ser reemplazado por vanadio o hierro (Ferguson, 1998).

Para el estudio de este tipo de microorganismos, han sido exitosamente empleadas aproximaciones tanto dependientes como independientes de cultivo, por ejemplo, Wright & Weaver (1981), utilizaron el recuento en placa en diferentes medios sin nitrógeno para identificar y enumerar las comunidades fijadoras de nitrógeno asociadas a la raíz de pastos para forraje. Durante su estudio, encontraron que dichas poblaciones se encontraban en el orden de 10^4 a 3×10^7 por gramo de raíz, destacándose que la mayoría de microorganismos aislados, pertenecían a las especies *Enterobacter cloacae* o *Klebsiella pneumoniae*. Asimismo, Warttinen *et al.* (2008), estudiaron estas comunidades en suelo rizosférico y no rizosférico de cultivos de arroz fertilizados y no fertilizados, mediante una aproximación independiente de cultivo, realizando una amplificación del gen *nifH* a partir de las muestras de suelo de cDNA y su posterior análisis en un DGGE; concluyendo que la comunidad de diazótrofos varía fuertemente entre sitios y tiempos de muestreo. Sin embargo, los mismos tipos de secuencias fueron encontrados en los diferentes tipos de suelo analizados.

2.3.3 Nitrificación

Continuando el ciclo del nutriente, el amonio liberado es utilizado por las bacterias nitrificantes las cuales lo transforman a nitrato. Este proceso, se produce en dos etapas y está mediado por dos grupos de microorganismos, las bacterias oxidadoras de amonio (BOA) y las bacterias oxidadoras de nitrito (BON). Este primer grupo de bacterias, catalizan la conversión de amonio a nitrito, en dos pasos, el primero catalizado por la enzima amonio monooxigenasa, la cual a partir de amonio produce hidroxilamina; en un segundo paso este producto es oxidado hasta nitrito por acción de una hidroxilamina oxidoreductasa (Ferguson, 1998). El segundo grupo de microorganismos que median este proceso del ciclo, poseen una enzima que es la nitrito oxidoreductasa, la cual media la oxidación de nitrito a nitrato. Generalmente, se asume que los microorganismos que pertenecen a estos grupos son aerobios y quimiolitautótrofos, que obtienen su energía a partir de la oxidación de estas dos formas de nitrógeno (Jackson *et al.*, 2008; Hayatsu *et al.*, 2008; Jetten, 2008); sin embargo, en algunos casos se ha descrito el crecimiento heterótrofo de organismos oxidadores de nitrito bajo algunas condiciones limitantes (Sylvia *et al.*, 2005). Asimismo, se han descrito procesos de oxidación heterótrofa de amonio, la cual se caracteriza porque no hay producción de energía, y generalmente se ha propuesto

como un mecanismo mediante el cual los microorganismos se liberan del exceso de poder reductor generado por el metabolismo oxidativo (Robertson & Kuenen, 1988).

El estudio de estos grupos de microorganismos por técnicas dependientes de cultivo, se ha realizado a través de la aproximación de número más probable. Sarathchandra (1978), analizó los cambios de las comunidades nitrificantes en el suelo función del pH, encontrando una distribución homogénea de este grupo a través de los agregados del suelo, así como, un mayor número de microorganismos nitrificantes a concentraciones de pH mayores. De otro lado, Papan & von Berg (1998), adecuaron la metodología de número más probable para realizar la estimación de las bacterias capaces de realizar nitrificación heterótrofa, en un suelo ácido proveniente de un bosque de coníferas, para lo cual determinaron la presencia/ausencia de los microorganismos en función de la producción de nitrato en un medio complejo (peptona, extracto de carne, con agar al 0.1%). Estos autores, encontraron que en este tipo de suelo la población capaz de realizar nitrificación heterótrofa representa una gran parte de los microorganismos heterótrofos. Además señalan que gracias al desarrollo de esta aproximación metodológica, varias cepas bacterianas de diferentes géneros lograron ser descritas como capaces de realizar este proceso de nitrificación heterótrofa.

Otro estudio que se enmarcan en dicha parte del ciclo, es el de Chu *et al.* (2007) quienes evaluaron el efecto de la fertilización mineral (NPK) y de la fertilización con materia orgánica, sobre la estructura de la comunidad de bacterias oxidadoras de amonio (BOA) durante un período de 16 años. Para llevar a cabo su objetivo, establecieron parcelas experimentales controladas donde transcurrido el tiempo de aplicación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos a cada suelo según el tratamiento asignado, realizaron mediciones del potencial de nitrificación, medido como el resultado de la producción de nitrato en el suelo a partir de la adición de una concentración conocida de amonio; así como la determinación de perfiles de la comunidad de oxidadores de amonio mediante un análisis de DGGE del gen *amoA*, amplificado a partir de DNA total extraído de cada muestra de suelo. Con estas observaciones, concluyen que la aplicación de fertilización nitrogenada a largo término induce un cambio en la comunidad de BOA, e incrementa el potencial de nitrificación del suelo, además determinan que existen efectos importantes del P y K sobre el potencial de nitrificación, por lo cual es importante mantener una fertilización NPK balanceada.

El estudio de las comunidades oxidadoras de nitrito, tampoco ha estado alejado del interés científico. Por ejemplo, Freitag *et al.* (2005) investigaron como las prácticas de manejo agrícola influyen en la diversidad de BON, examinando las comunidades de *Nitrospira* y *Nitrobacter* en suelos de pastizales. Para esto, diseñaron primers específicos para amplificar el gen 16s rRNA de dichos grupos y los utilizaron para la amplificación del gen a partir de muestras de DNA total extraído del suelo. Sus resultados indican además de la amplia diversidad de secuencias de *Nitrobacter* y *Nitrospira* en el medio ambiente, cambios en la estructura de la comunidad, representados a través de la ganancia o pérdidas de secuencias (“individuos”), lo cual implica que hay una selección de los miembros de la comunidad en función de los cambios introducidos por el manejo agrícola.

Las comunidades de microorganismos nitrificantes, especialmente los pertenecientes al grupo de bacterias oxidadoras de amonio, han sido recientemente estudiados a través de aproximaciones metagenómicas. Leninger *et al.*, (2006), demostraron que las archeas del phylum Crenarchaeota eran los procariontes oxidadores de amonio con mayor representación en el suelo, ya que al estudiar los ribotipos (secuencias del gen 16s rRNA) asociadas a este phylum, encontraron una representación mayor de estos organismos respecto a otros procariontes oxidadores de amonio reportados. Adicionalmente, la cantidad de secuencias asociadas al gen *amoA* proveniente de este tipo de organismos era 3000 veces mayor que el número de secuencias proveniente del gen *amoA* de organismos del dominio bacteria oxidadores de amonio; además, observan que la distribución de el gen *amoA* proveniente de este phylum de archeas mostraba un patrón de distribución similar a la distribución de perfiles lípidicos de la pared celular de archeas. En estudios posteriores, Roesch *et al.* (2007) y Ulrich *et al.*, (2008) al analizar la proporción de ribotipos asociados a microorganismos que intervienen en el proceso de oxidación de amonio, también encuentran que la proporción de secuencias asociadas al dominio archaea es mucho mayor que la del dominio bacteria.

2.3.4 Denitrificación

Un paso adicional que completa el ciclo, es la denitrificación o respiración de nitrato, esta generalmente se presenta cuando organismos heterótrofos en condiciones limitantes de oxígeno, utilizan el nitrato como un aceptor alternativo de electrones, produciendo N_2O y N_2 (Philippot & Hallin, 2005). Este es un proceso de varias etapas, en primer lugar intervienen las

enzimas nitrato reductasas que reducen el nitrato a nitrito; posteriormente, el nitrito es convertido a óxido nítrico por acción de las nitrito reductasas; este óxido nítrico, es utilizado por las óxido nítrico reductasa en un proceso que produce óxido nitroso, que finalmente es reducido a nitrógeno diatómico por la óxido nitroso reductasa (Ferguson, 1998).

La población de organismos denitrificantes, ha sido de interés en diferentes estudios; tal es el caso del trabajo desarrollado por Enwall y colaboradores (2005), quienes exploran los efectos a largo tiempo (46 años) de fertilizantes nitrogenados orgánicos e inorgánicos en la composición y actividad de las comunidades denitrificantes del suelo. Así, para determinar los cambios en la actividad de la comunidad, realizaron mediciones del potencial de denitrificación, a través de la prueba de bloqueo con acetileno; mientras que para determinar cambios en la composición, observaron los perfiles moleculares de los genes *narG* y *nosZ* (que codifican para la nitrato reductasa y óxido nitroso reductasa) a través de las técnicas moleculares de RFLP y DGGE respectivamente. Transcurridos los tiempos de estudio, encuentran altos potenciales de denitrificación en los tratamientos que contenían altos contenidos de carbón orgánico total. Además, encuentran que aunque hay tratamientos similares en términos de función, estos son diferentes en su estructura, por lo cual proponen que puede existir una actividad potencial desacoplada con la estructura de la comunidad. Por último, concluyen que el régimen de fertilización a largo plazo, puede afectar la actividad y la composición de la comunidad denitrificante.

Por otro lado, Amora – Lozano *et al.* (1998) estudiaron los cambios en la proporción de microorganismos denitrificantes, nitrificantes y amonificantes a través de la aproximación del número más probable en parcelas experimentales cultivadas con maíz en presencia y ausencia de micorrizas. Observaron que en los suelos de parcelas experimentales con micorrizas, los recuentos de microorganismos nitrificantes era superior, mientras que los recuentos de microorganismos amonificantes y denitrificantes eran inferiores. Concluyen que la colonización con micorrizas afecta a estos grupos del ciclo del nitrógeno, presuntamente por cambios en la disponibilidad de nutrientes, como por ejemplo los suministrados a través de la exudación radicular.

2.3.5 Reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA)

Otro proceso de reducción de nitrato frecuentemente reportado en el suelo, es la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA), la cual se desarrolla bajo condiciones anaeróbicas, y donde el nitrato es reducido a nitrito produciendo energía; el nitrito producido es reducido en pasos posteriores a amonio en un proceso que no presenta una ganancia neta de energía, por lo cual, se cree que este proceso es llevado a cabo por los microorganismos con el propósito de detoxificar el nitrato intermediario o de regenerar equivalentes reducidos a través de la utilización de NADH (Sylvia *et al.*, 2005).

Este proceso del ciclo del nitrógeno, y los microorganismos involucrados en este han sido estudiados mediante el establecimiento de microcosmos y la determinación del consumo de nitrato marcado con ^{15}N al suelo (Yin *et al.*, 2002; Fazzolari *et al.*, 1998), a partir de estos experimentos se ha observado que ante la adición de fuentes de carbono como la glucosa, la proporción de microorganismos DNRA aumenta considerablemente, en relación a la población de microorganismos denitrificantes, y que en relación a este último grupo de microorganismos, presentan una menor sensibilidad a las concentraciones de oxígeno.

Por otro lado, Hansel *et al.*, (2008), evaluaron la representación de géneros de grupos funcionales del nitrógeno, tales como organismos que participan en la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio, microorganismos nitrificantes y denitrificantes, a través de la búsqueda del número de secuencias del gen 16s rRNA de géneros asociados a cada proceso, en librerías de clones de DNA metagenómico del suelo. Sin embargo, no lograron identificar secuencias asociadas a ninguno de estos procesos, e incluso al amplificar genes específicos para cada proceso como lo son *nirK*, *nirS* y *amoA*, no encontraron amplificación, por lo cual explican que dicho resultado puede ser consecuencia de una baja abundancia en secuencias de microorganismos asociadas a este proceso como consecuencia de sesgos en la PCR realizada para la construcción de librerías o durante la extracción del DNA en las muestras de suelo.

2.3.6 Asimilación de nitrógeno.

Dentro de los procesos del ciclo del nitrógeno, la asimilación (inmovilización) de compuestos de nitrógeno es quizás uno de los pasos más importantes que determina la disponibilidad de este elemento. La planta y los microorganismos del suelo, para suplir sus necesidades de nitrógeno, utilizan y compiten principalmente por amonio, nitrato y algunos compuestos orgánicos como aminoácidos (Jackson *et al.*, 2008).

Con el propósito de identificar la preferencia de las plantas y microorganismos del suelo, por diferentes fuentes de nitrógeno, Harrison *et al.* (2007) suplementaron un suelo templado, con diferentes fuentes de nitrógeno mineral (amonio y nitrato), marcados con ^{15}N , así como aminoácidos de diferente complejidad también marcados con ^{15}N . Durante su experimento, observaron que diferentes tipos de plantas tienen la capacidad de asimilar diferentes fuentes de nitrógeno tanto orgánicas como inorgánicas, aunque presentan una mayor preferencia por las fuentes inorgánicas respecto a las orgánicas, y mayor afinidad por fuentes orgánicas simples en relación con fuentes orgánicas complejas, representadas en la cantidad de ^{15}N de cada forma acumulado. En el caso de los microorganismos, no se evidenció algún patrón particular de acumulación de ^{15}N , por lo cual se concluye que estos no presentan una afinidad especial por alguna de las formas de nitrógeno incorporadas; sin embargo, si se observó que estos son mejores competidores en el corto plazo (50 horas) que las plantas dado que presentan mayores tasas de acumulación de nitrógeno marcado, pero tiempo después (33 días), la proporción de nitrógeno marcado contenido en la planta aumentó, mientras que en la biomasa microbiana disminuyó, lo cual podría ser consecuencia del metabolismo microbiano del ^{15}N , que permite que el nitrógeno sea incorporado nuevamente al sistema planta – suelo, o a procesos de mineralización del ^{15}N transferido inicialmente a la materia orgánica. En conclusión, estos autores sugieren que la presencia de diferentes tipos de plantas, las hace más eficientes en la competencia de estas con los microorganismos por las diferentes formas de nitrógeno del suelo, y que cada especie de planta muestra preferencias similares por compuestos inorgánicos sobre compuestos orgánicos de nitrógeno.

En relación con la asimilación de fuentes inorgánicas de nitrógeno, se resalta que la inmovilización de amonio, es un proceso contrario a la amonificación y es llevado a cabo principalmente por dos vías que involucran la participación de tres enzimas como son la

glutamato dehidrogenasa y la glutamina sintetasa - glutamato sintetasa (Sylvia *et al.*, 2005). Sin embargo esta función ha sido relativamente inexplorada en el suelo; aunque, se resalta el trabajo de Wang y colaboradores (2009), quienes estudiaron la presencia del gen marcador *gdh* (que codifica para la glutamato dehidrogenasa), en muestras de chimeneas hidrotermales de las profundidades del océano, a través de un microarreglo que contenía sondas para dicho gen provenientes de diferentes organismos. Encontraron que si bien dicho gen está presente en todas las muestras analizadas, los microorganismos a los cuales pertenecía dicho gen si eran diferentes entre muestras, lo cual podría indicar que dado que esta es una función primaria para el desarrollo microbiano, esta va a estar representada en el microarreglo en todas las muestras analizadas, pero que las condiciones propias de cada ambiente seleccionan poblaciones especialmente adaptadas para desempeñar esta función en el ecosistema.

La asimilación de nitrato, se caracteriza porque se requiere de energía para la conversión de nitrato a amonio y la subsecuente incorporación de amonio a los aminoácidos. Cabe resaltar, que las plantas varían en su preferencia de utilización de nitrato o amonio, sin embargo, en términos energéticos para la planta es más favorable utilizar amonio, porque el nitrato debe ser reducido primero a amonio para que pueda ser asimilado, aunque en la mayoría de los casos las plantas no se encuentran energéticamente limitadas, por lo que se dispone de poder reductor para realizar dicha conversión. En el caso de los microorganismos, si es posible que estos se encuentren limitados en fuentes de energía, por lo que este proceso será determinado principalmente por su balance energético (Sylvia *et al.*, 2005).

2.3.7 Pérdida de formas nitrogenadas del suelo.

Un punto importante que debemos considerar, es que si bien el nitrógeno circula a través del ecosistema de manera cíclica, en el suelo existen procesos que generan el “escape” de alguna de las formas reactivas de nitrógeno, desencadenando un desbalance en el ciclo global del nitrógeno (Galloway *et al.*, 2008; Jenkinson, 2001). En primer lugar, por incrementos en el pH, temperatura y porosidad del suelo, el amonio puede ser convertido a amoniaco, el cual posteriormente puede ser volatilizado (van Cleemput & Boeckx, 2006); además, durante procesos de denitrificación parciales en los cuales el nitrato no es completamente reducido a nitrógeno diatómico, se producen formas gaseosas de nitrógeno como el NO y N₂O (Philippot &

Hallin, 2005), lo cual al parecer está determinada por el contenido de humedad del suelo y la disponibilidad de formas de nitrógeno minerales en el suelo como consecuencia de la intensificación de la producción agrícola (van Cleemput & Boeckx, 2006). Un tercer proceso que genera la pérdida de nitrógeno en el ecosistema es la lixiviación de nitrato a fuentes superficiales o subterráneas de agua, dado que este es un elemento altamente móvil (Smil, 1997; Vitousek *et al.*, 1997), en general se acepta que dentro de los factores que influencia dicha pérdida de nitrato son la frecuencia de irrigación, la tasa de evaporación, la textura, estructura y temperatura del suelo, el uso del suelo, las prácticas de arado y la cantidad y forma de fertilización nitrogenada aplicada (van Cleemput & Boeckx, 2006).

2.3.7 Consideraciones finales del metabolismo edáfico del nitrógeno.

En relación a lo expuesto para el estudio del ciclo del nitrógeno en el suelo, cabe resaltar que aunque se han hecho nuevos descubrimientos de procesos y organismos relacionados con el ciclo del nitrógeno, tales como la oxidación anaeróbica de amonio (anammox), la nitrificación mediada por archeas, procesos de denitrificación, fermentación de nitrato y codenitrificación realizados por hongos y la oxidación de nitrito por fototrófos; actualmente conocemos sólo un poco de la enorme biodiversidad y capacidad metabólica que tienen los microorganismos para realizar conversiones químicas del nitrógeno (Hayatsu *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2002; Richardson & Watmough, 1999).

Además, se puede evidenciar que la investigación científica en diferentes aspectos del ciclo del nitrógeno ha sido amplia, lo cual se refleja en diferentes artículos de investigación que en su mayoría presentan el estudio separado de algunas de las comunidades microbianas que intervienen en el metabolismo edáfico del nitrógeno; aunque, el estudio puntual de cada grupo funcional, dificulta la extrapolación de los resultados a una visión real de la problemática del ciclo del nitrógeno en los ecosistemas agrícolas. Sin embargo, estos estudios son importantes, porque demuestran que hay influencias de las variables físico-químicas del suelo, así como del manejo agronómico sobre las comunidades relacionadas con este ciclo, lo cual garantiza que es posible hacer un seguimiento y relación de las mismas en un ecosistema y manejo agrícola particular, como es el cultivo de la papa criolla.

2.4 Aproximaciones metodológicas para el estudio de comunidades microbianas del suelo.

La diversidad microbiana describe la complejidad y variabilidad a diferentes niveles de organización biológica; considerando las diferencias en número de taxones (riqueza), abundancia relativa de taxones (uniformidad) y grupos funcionales (gremios) en las comunidades. Además, cabe resaltar que dada la amplia gama de procesos en los que intervienen los microorganismos, la complejidad de sus interacciones y el número de niveles tróficos, la estimación de la diversidad microbiana debe incluir la integración de múltiples métodos y enfoques integrales que permitan la medición de la diversidad a nivel de la comunidad total y parcial, principalmente de subconjuntos estructurales o funcionales (Torsvik & Øvreas, 2002).

Los métodos empleados para el análisis de las comunidades microbianas, pueden ser clasificados como métodos dependientes e independientes de cultivo (Nannipieri *et al.*, 2003), los cuales como vimos en la sección anterior han sido aplicados exitosamente para el estudio de las comunidades edáficas asociadas al metabolismo edáfico del nitrógeno. La Figura 2 presenta un esquema general de cómo se puede abordar el estudio de las comunidades de microorganismos a través de estas dos aproximaciones metodológicas.

En las aproximaciones dependientes de cultivo, los microorganismos son crecidos y aislados en medios sintéticos, y posteriormente analizados individualmente; mientras que, en la aproximación independiente de cultivo, el DNA extraído del suelo, puede ser analizado de dos formas; la primera, consiste en realizar un análisis parcial del DNA de la comunidad, a través de la selección y amplificación por PCR de una secuencia de interés, posteriormente dichos productos de PCR pueden ser analizados por “fingerprint” genético (análisis de perfiles de restricción o electroforéticos), o pueden ser clonados y posteriormente caracterizados permitiendo hacer un análisis de la diversidad genética de la comunidad así como, de la afiliación filogenética de los miembros de la comunidad. La segunda forma de análisis en las aproximaciones independientes de cultivo, consiste en analizar el DNA total de la comunidad, ya sea por cinéticas de reasociación, el contenido de guanina y citosina (Ranjar *et al.*, 2000), o como se discute más adelante mediante aproximaciones metagenómicas.

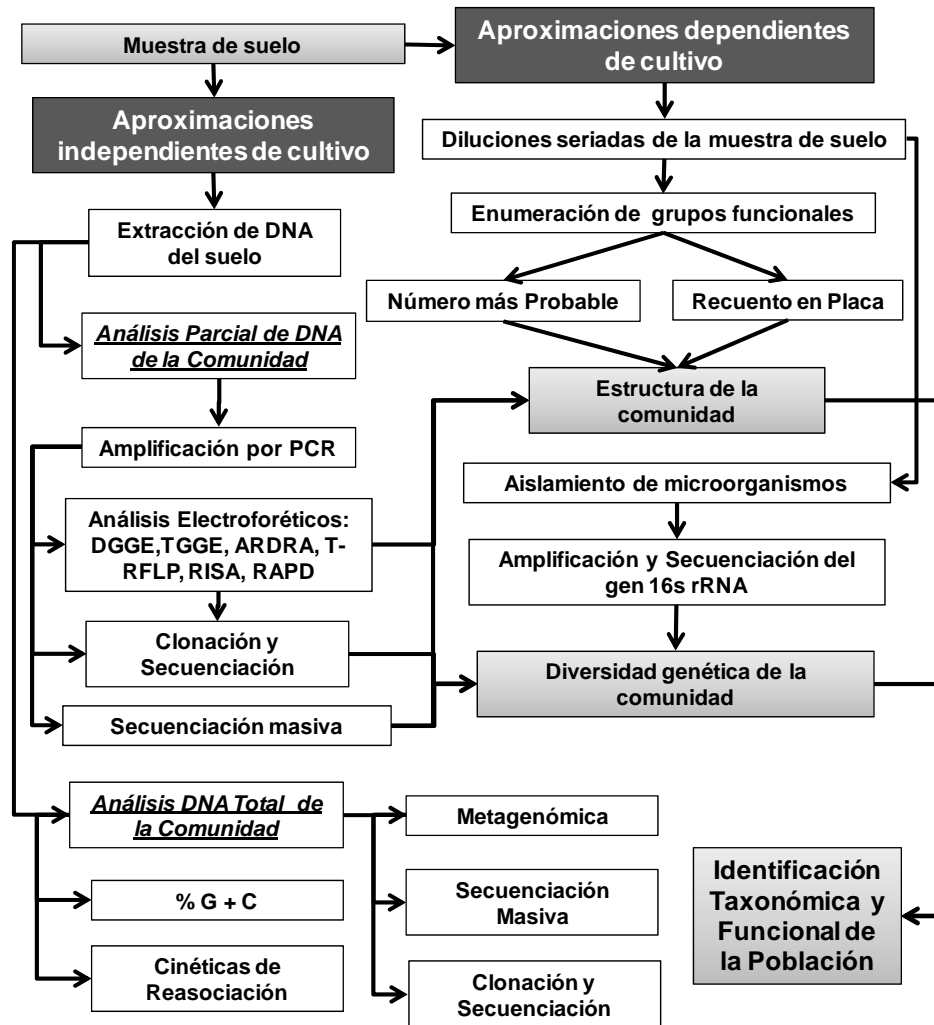


Figura 2. Aproximaciones metodológicas para el estudio de comunidades edáficas. Modificado por el autor a partir de Ranjar et al., (2000)

2.4.1 Aproximaciones dependientes de cultivo

El recuento en placa, se fundamenta en que cada microorganismo viable se desarrolla y se reproduce hasta formar una colonia de tal manera que la cuenta de colonias en la placa nos indica el número de bacterias viables del inóculo (en este caso suelo) (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007;). Por otro lado, la técnica de número más probable se basa en la determinación de la presencia o ausencia de un determinado tipo de microorganismo, en función del crecimiento (turbidez), consumo de un nutriente, transformación algún componente del medio, o

producción de un metabolito particular, en cantidades decrecientes de muestra (Oblinger & Koburger, 1975).

Otra aproximación, son los análisis de utilización de fuentes de carbono y los perfiles fisiológicos de la comunidad, los cuales son dependientes de cultivo y se basan en técnicas bioquímicas. Estos se fundamentan principalmente en que dado que las fuentes de carbono disponibles delimitan la comunidad de microorganismos asociada a un ambiente en particular, un cambio en la composición de la comunidad debería verse reflejado en un cambio en la utilización de sustratos. Dentro de las ventajas que presenta esta aproximación es que es rápida, económica y genera simultáneamente una gran cantidad de información; sin embargo, al ser dependiente de cultivo, restringe el análisis a sólo aquellas comunidades que pueden ser cultivadas, además, es sensible a la densidad de inóculo (Nannipieri *et al.*, 2003; Kirk *et al.*, 2004).

Algunas de las ventajas de estos métodos es que son rápidos, económicos y pueden proporcionar información de parte del componente activo de la comunidad (Kirk *et al.*, 2004). Sin embargo, diferentes autores resaltan que solo entre un 1 y 10% de la microflora del suelo puede ser cultivada, como consecuencia de la interdependencia de diferentes organismos, así como, de la inhabilidad de reproducir las condiciones ambientales propias del suelo (Torsvik & Øvreas, 2002, Nannipieri *et al.*, 2003, Nocker *et al.*, 2007). Así, las aproximaciones moleculares podrían ser una solución a la dificultad de estudiar las comunidades a través de técnicas independientes de cultivo.

2.4.2 Aproximaciones independientes de cultivo

Los métodos independientes de cultivo, los cuales están basados en la extracción del DNA total ambiental han sido implementados exitosamente para describir cambios en la estructura de comunidades de organismos tanto cultivables como no cultivables (Kirk *et al.*, 2004, Nocker *et al.*, 2007, Tiedje *et al.*, 1999). Dentro de dichas metodologías se resaltan las técnicas de “fingerprinting”, las cuales permiten identificar cambios en la estructura de una comunidad particular, a través del estudio de un gen biomarcador como el 16s rRNA o región no codificante en la muestra de DNA total extraído (Handelsman *et al.*, 2007). Algunas de estas metodologías son el análisis de regiones inter espaciales ribosomales (RISA), la amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD), análisis de polimorfismos en los fragmentos de restricción

(RFLP), análisis de restricción del DNA ribosomal (ARDRA), análisis de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) y el análisis de electroforesis en geles en gradiente denaturante (DGGE).

En general algunas ventajas de estas técnicas, es que al ser independientes de cultivo permiten el estudio tanto de comunidades cultivables como no cultivables y son relativamente sensibles a los cambios de composición de la comunidad; sin embargo, presentan desventajas como que dependen de la calidad del DNA extraído y presentan el sesgo de la PCR, ya que durante este proceso se ven enriquecidas las secuencias de los organismos más abundantes, pudiendo perderse información de los organismos menos representados (Kirk *et al.*, 2004).

Asimismo, dentro de otras aproximaciones para el estudio de la diversidad de las comunidades del suelo, se destacan las estrategias metagenómicas, las cuales buscan el estudio de los genomas de “todos” los microorganismos presentes en un ambiente (Handelsman *et al.*, 1998). Dicha aproximación ha presentado grandes avances, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación, tales como la pirosecuenciación (Figura 3) en el sistema *Roche Diagnostics 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX* (Handelsman *et al.*, 2007). Dentro de las características de que han hecho que esta metodología recobre tanta importancia, es que elude la necesidad de clonación, dado que utiliza la técnica de PCR en emulsión como método de amplificación de DNA *in vitro*. Además, las placas donde la secuenciación es llevada a cabo permiten que se realicen miles de reacciones de pirosecuenciación en paralelo, incrementando el rendimiento del proceso. Esta estrategia se caracteriza además, por ser una técnica de secuenciación por síntesis, durante la cual el DNA molde es inmovilizado y las soluciones de dNTPs son agregadas una a la vez; así, cada vez que un nucleótido es incorporado se libera un pirofosfato, este es detectado utilizando como referencia la luz producida por una enzima quimioluminiscente presente en la mezcla de reacción. La secuencia se obtiene entonces por un “pirograma” que corresponde al orden en el que los nucleótidos fueron incorporados (Morozova & Marra, 2008).

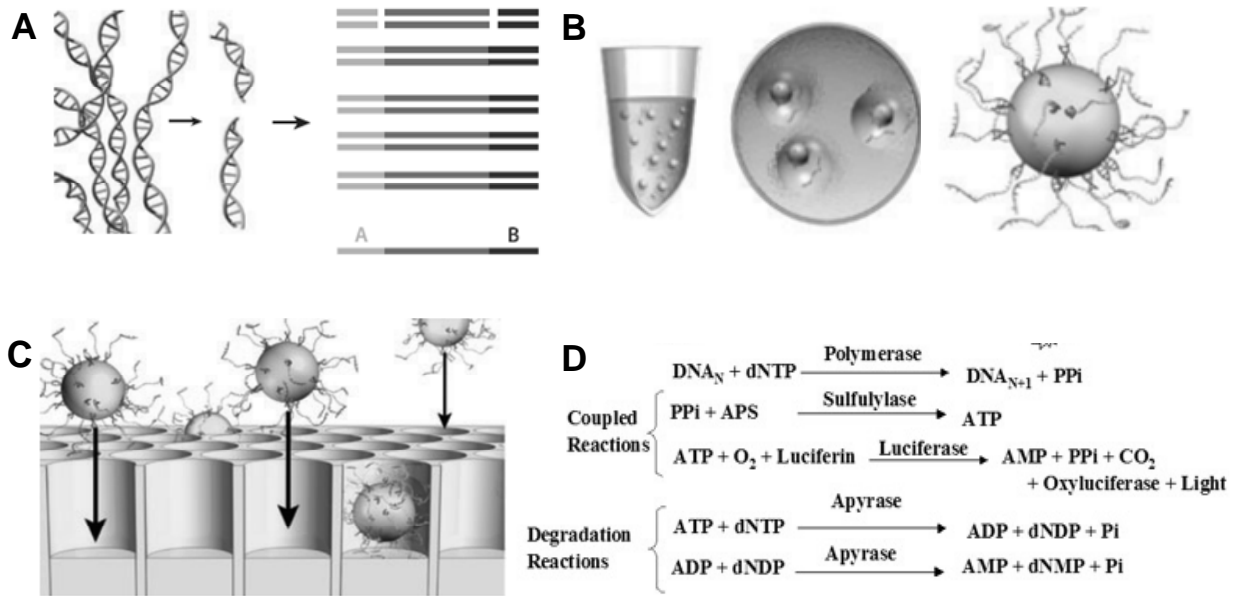


Figura 3. Metodología de pirosecuenciación. A. Al DNA para la secuenciación se le ligan adaptadores de secuencia complementaria a la de adaptadores contenidos en esferas de agarosa. B. Se realiza una PCR en emulsión con el propósito de amplificar el fragmento de DNA que va a ser secuenciado, de manera tal que en cada pozo de reacción se produzca una señal lo suficientemente fuerte durante la reacción de pirosecuenciación. Cada esfera queda recubierta con aproximadamente un millón de copias del fragmento original. C. Cada esfera con el DNA original amplificado, es depositada en pozos de 44 μm , en los cuales 400.000 lecturas son obtenidas en paralelo. D. La química de la reacción de pirosecuenciación, se fundamenta en que cada vez que un nucleótido es incorporado, se genera un pirofosfato que es sustrato para una sulfilasa, que convierte APS en ATP, el cual posteriormente es utilizado por una enzima luciferasa, que junto con luciferina produce luz, la señal que es detectada. Para garantizar que no haya interferencia entre un paso de reacción y otro, una apirasa es adicionada para retirar los reactivos que no reaccionaron. Modificado por el autor a partir de Mardis (2008) y http://med.stanford.edu/sgtc/technology/images/high_throughput.jpg.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las transformaciones ambientales del nitrógeno en el suelo, comprenden una amplia gama de procesos mediados por poblaciones de microorganismos, que se ven afectadas con la implementación de las diferentes prácticas de manejo agrícola, así como por las condiciones ambientales propias del suelo. A su vez, dichas transformaciones microbianas, junto con ciertos factores ambientales como la humedad, la estructura del suelo y la temperatura, son los que regulan la disponibilidad de fuentes de nitrógeno asimilables para la planta, las cuales son necesarias para su desarrollo y productividad.

En respuesta a las demandas de nitrógeno de la planta, la aplicación de fertilizantes nitrogenados minerales tales como amonio y nitrato o de enmiendas orgánicas; es una práctica de los agricultores en busca de aumentos en la producción, a pesar de que esto implique un incremento en los costos de producción del cultivo. Sin embargo, cuando dicha fertilización no es aplicada en niveles apropiados, se genera un desequilibrio en el ciclaje de este elemento, dando lugar a pérdidas de especies nitrogenadas que desencadenan una serie de efectos negativos sobre el medio ambiente, la salud humana y la productividad del cultivo.

El cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*), se desarrolla en agroecosistemas altoandinos, caracterizados por su baja temperatura, lluviosidad variable, altos contenidos de materia orgánica y nivel de bajos pH en los suelos; características que deben ser determinantes para el ciclaje del nitrógeno. Además, el esquema tradicional del cultivo (que representa la mayoría) se caracteriza por la aplicación de fertilizantes minerales, basados en la cultura de manejo del cultivo, es decir, que las aplicaciones de fertilizantes no se realizan en función de los requerimientos nutricionales de la planta, sino por calendario.

De acuerdo con la situación planteada arriba, el presente trabajo busca aproximarse al entendimiento del metabolismo edáfico del nitrógeno, a través de una mirada holística a los grupos de microorganismos asociados a su metabolismo, analizados desde aproximaciones metodológicas diferentes, con el propósito de establecer relaciones de dichos organismos con variables físico- químicas, bioquímicas y agronómicas, con la intención de identificar puntos

críticos del ciclaje del nutriente en los cultivos de papa criolla, ya que como se describió anteriormente, la disponibilidad de este elemento para la planta está determinada por los microorganismos que median sus transformaciones y compiten con ella por este elemento en el suelo, así como por factores ambientales que pueden ser los responsables de pérdidas o “fugas” de especies de nitrógeno asimilables para la planta, disminuyendo la eficiencia de la fertilización nitrogenada aplicada. Lo anterior, sería una primera aproximación que a futuro facilitaría la formulación de enmiendas, la racionalización de la aplicación de fertilizantes, así como una selección más idónea del fertilizante apropiado para dicho agroecosistema, en función de los microorganismos prevalentes bajo las condiciones ambientales del cultivo.

Este estudio representa además, una oportunidad para el conocimiento de la diversidad microbiana de los suelos altoandinos, un ecosistema único; así como, una contribución a la comunidad científica en lo relacionado con la dinámica del nitrógeno en el suelo y la ecología de las poblaciones microbianas del mismo que intervienen en su transformación, mediante el aporte de evidencia experimental.

4. JUSTIFICACIÓN

En comparación con otros cultivos, en Colombia la papa ocupa el noveno lugar en extensión, y el sexto en valor de producción (Espinal *et al.*, 2005). Además, este sector genera alrededor de 104.456 empleos directos, más otros empleos indirectos relacionados con los procesos de distribución de insumos, empaques, maquinaria, semillas, procesamiento y comercialización (Espinal *et al.*, 2003). Asimismo, este cultivo es importante ya que se estima que unas 90.000 familias derivan sus ingresos a partir del mismo, y genera la demanda de otros servicios, por ejemplo es la actividad económica que más requiere servicios de transporte terrestre, con más de dos millones de toneladas de tubérculo al año (CEVIPAPA, 2004). Por otro lado, cabe destacar que el cultivo de papa, ocupa el primer lugar en el consumo de fungicidas e insecticidas y el segundo de fertilizantes químicos (Villareal *et al.*, 2007). Además, dado que es un producto de alto consumo y hace parte de la canasta familiar, el cultivo de la papa desempeña un papel importante en la definición del índice general de precios de la economía ya que posee una gran incidencia en el presupuesto de las familias colombianas, hasta tal punto, que se ha evidenciado que en los períodos de mayor influencia, el 30% de la inflación puede ser explicada por los cambios en los precios de la papa (Espinal *et al.*, 2005).

En Colombia, la papa criolla (*Solanum phureja*) representa aproximadamente el 10% del total de la papa producida en el país (Ñústez, 2001), siendo los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Nariño los principales productores (Martínez, 2006). Aunque, la representación de esta especie es baja respecto a la producción de papa del país, cabe mencionar que es uno de los recursos genéticos con mayor importancia dado su valor nutricional, características culinarias y su potencial de exportación como producto exótico (Porrás, 2000).

En pro de identificar los frentes susceptibles de intervención para potenciar la producción de papa criolla en el país, se resalta que los fertilizantes, abonos y correctivos representan aproximadamente entre un 14 y 23% de los costos totales de producción. Por lo cual, el gremio de productores de papa, reconoce el peso significativo de los agroquímicos en los costos de producción de papa, e indican que es prioritario implementar programas tendientes a racionalizar su uso, lo cual implica la utilización masiva del análisis de suelos como fundamento para mejorar la eficiencia de las aplicaciones y el desarrollo de estrategias que permitan

disminuir las cantidades utilizadas, mediante la búsqueda de alternativas orgánicas y biológicas (Villareal *et al.*, 2007).

La planta asimila nitrógeno durante todo su ciclo vegetativo, aunque se estima que 50% del total de la absorción de estos elementos por la planta ocurre durante el periodo comprendido entre la emergencia y el inicio de la floración (Villamil, 2005), lo cual evidencia su gran influencia en el desarrollo vegetal y la productividad. No obstante, la aplicación de compuestos nitrogenados para aumentar el crecimiento de la planta puede contaminar el ambiente, si la fertilización no se encuentra temporal y espacialmente ajustada a los requerimientos propios de la planta (Schloter *et al.*, 2003); lo cual, podría ser el caso del cultivo de papa criolla en Colombia, ya que normalmente el agricultor toma simplemente como referente la cultura de manejo del cultivo, para llevar a cabo la fertilización del mismo (Ruiz, 2005).

A nivel mundial, los fertilizantes de tipo nitrogenado han tomado especial importancia, ya que desde hace varias décadas se conocen y se han acumulado los efectos negativos que generan estos en el medio ambiente y la salud humana como consecuencia de una alteración en el ciclo global del nitrógeno; a tal punto que, se ha estimado que cerca del 50% del nitrógeno que es aplicado en forma de fertilizante tiene efectos negativos en la regulación y mantenimiento de los servicios del ecosistema relacionados con el metabolismo del nitrógeno, los cuales en últimas soportan la calidad ambiental (Jackson *et al.*, 2008). Según Galloway *et al.* (2008), los seres humanos continuamos transformando el ciclo de nitrógeno a un paso acelerado, lo que se refleja en un aumento en la utilización de combustibles fósiles, la demanda creciente de nitrógeno en la agricultura e industria y las generalizadas ineficiencias en su uso.

Como consecuencia de las nuevas entradas de nitrógeno se han desencadenado desequilibrios en su ciclo. En primer lugar, el nitrato y amonio pueden perderse en forma de emisiones de gases como NH_3 , N_2O , NO y NO_2 (Mansfield *et al.*, 1998); según Galloway (1995), de los 47 millones de amoniaco producidos, 10 millones provenían de la volatilización de los fertilizantes nitrogenados. Por otro lado, la producción de N_2O , como consecuencia de la agricultura fue estimada por Mosier *et al.* (1998) en 2.1 millones de toneladas al año. Lo anterior, es preocupante si consideramos que estos gases, en especial este último es un potente gas que contribuye al efecto invernadero y además se ha visto involucrado con el deterioro de la capa de ozono (Bouwmann *et al.*, 1996). De otro lado, la lixiviación de

fertilizantes especialmente de nitratos, los cuales pueden llegar a cuerpos de agua tales como estanques, lagos o bahías, también se propone como un problema ambiental causado por el desbalance en el ciclo del nitrógeno. Esta situación puede causar problemas de eutrofización, en el cual las aguas son enriquecidas por un nutriente anteriormente escaso, y en consecuencia algunos organismos como cianobacterias y algas pueden crecer sin moderación, disminuyendo la cantidad de oxígeno disponible para especies de peces y crustáceos, llevando a la pérdida progresiva de biodiversidad (Smil, 1997; Vitousek *et al.*, 1997).

Adicionalmente, se han descrito diferentes efectos negativos en la salud humana de compuestos nitrogenados intermediarios del ciclo del nitrógeno. En este sentido merece destacar la exacerbación de enfermedades pulmonares como consecuencia de las emisiones de óxido nítrico y amonio; desarrollo de cáncer, problemas reproductivos y el desarrollo de metahemoglobinemias, al consumir aguas con altos contenidos de nitrato. Igualmente, se propone que el exceso de nitrógeno, puede aumentar la prevalencia de algunas enfermedades infecciosas importantes, como por ejemplo la malaria, el cólera y la esquistomiasis, ya que se ha evidenciado que los cambios en el ciclo global del nitrógeno, inducen cambios ecológicos que cambian las poblaciones de parásitos o agentes infecciosos y la densidad de los vectores (McKenzie, & Townsend, 2007).

Lo anterior, es importante si consideramos que además del deterioro de los recursos naturales y de la salud humana, las pérdidas de nitrógeno indican que los actuales esquemas de fertilización no son eficientes, ya que las formas de nitrógeno que se están perdiendo (amonio y nitrato) son principalmente aportadas por esta, y representan una disminución importante del nitrógeno fácilmente asimilable para la planta. Lo anterior, puede ser interpretado como pérdidas económicas importantes para el sector agrícola; lo cual es aún más preocupante, si pensamos que la demanda por alimentos y energía seguirá incrementando y por tanto la cantidad de nitrógeno creado (fijado) por el hombre y la magnitud de los problemas también incrementará (Galloway *et al.*, 2008).

5. HIPÓTESIS

El análisis integral de diferentes parámetros bioquímicos, físico – químicos y de poblaciones o grupos funcionales de microorganismos determinantes en la regulación y la disponibilidad del nitrógeno en los suelos cultivados con papa criolla bajo estudio, permitirá discutir el efecto de los factores bioquímicos, físico – químicos y agronómicos (determinados por el estudio de suelos con manejo agrícola contrastante) sobre las comunidades edáficas asociadas al ciclaje de este nutriente; de tal manera que el análisis de dichas comunidades será útil para identificar puntos críticos en el ciclaje de este elemento en los suelos analizados.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar la presencia de los diferentes grupos funcionales de microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno y su relación con parámetros bioquímicos, físicos y químicos asociados al metabolismo edáfico de dicho elemento en cultivos de *Solanum phureja* del departamento de Cundinamarca

6.2 Objetivos Específicos

Estimar la abundancia de microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno (Fijadores de Nitrógeno, Proteolíticos, Amonificantes, Oxidadores de Amonio, Oxidadores de Nitrito y Denitrificantes), en muestras de suelo rizosférico de cultivos de papa criolla.

Determinar algunas características físicas – químicas y enzimáticas (proteasa y nitrogenasa), en los suelos bajo estudio y establecer su relación con los parámetros biológicos evaluados.

Determinar las secuencias procedentes de la caracterización filogenética de la comunidad bacteriana asociada al ciclaje del nitrógeno, obtenidas en los suelos bajo estudio por técnicas independientes de cultivo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Sitio y recolección de las muestras

Se recolectaron muestras de suelo rizosférico, provenientes de siete cultivos de papa criolla (*Solanum phureja*) ubicados en el departamento de Cundinamarca, una de las zonas de mayor siembra de esta especie de papa en Colombia. Una característica importante de estos cultivos, es que todos se encontraban en etapa de floración, en el momento del muestreo. Además, como se presenta en la Tabla 1, cinco de estos cultivos tenían manejo tradicional, donde se aplicaban fertilizantes NPK compuestos (en relación 12:24:12 y 14:30:15) a razón de 700 a 900 Kg/Ha , y dos cultivos manejo orgánico, caracterizados por la aplicación de enmiendas tipo bocachi (Anexo 1). De cada cultivo, se tomaron cinco muestras (la planta era arrancada y el suelo adherido a la raíz era recolectado) de diferentes puntos seleccionados a medida que el terreno era recorrido en zig-zag, dejando una distancia entre 20 – 25 metros dependiendo del tamaño del terreno.

Cada una de las cinco submuestras fue tamizada con un tamiz de aproximadamente 0.5 cm, posteriormente fueron mezcladas por partes iguales para conseguir tres muestras compuestas por finca, la primera de ellas fue almacenada a 4°C, y fue destinada para los análisis microbiológicos y físico – químicos, mientras que, la segunda fue guardada a -20°C para ser utilizada para las determinaciones enzimáticas; la tercer muestra fue almacenada a - 80°C y utilizada para los procesos de extracción de DNA y análisis de la comunidad por metodologías independientes de cultivo. Adicionalmente, para las fincas de manejo tradicional se consideraron los datos de producción y fertilización NPK suministrados por cada agricultor para el análisis.

7.2 Caracterización físico – química

El análisis físico – químico de los suelos se realizó en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, empleando las siguientes metodologías: pH por valoración potenciométrica; carbono orgánico según Walkley-Black; Ca, K, Mg, Na por absorción atómica; capacidad de intercambio catiónico por el desplazamiento

del NH_4 intercambiado con NaCl 1M; P disponible según el método de Bray II; Cu, Fe, Mn: por absorción atómica por extracción con DTPA; arcilla, limo y arena por el método de Bouyoucos, previa dispersión con hexametáfosfato de sodio; nitrógeno total según el método de semi-micro Kjeldahl; amonio y nitrato por extracción con KCl 2N, destilación con MgO y aleación de Devarda respectivamente. Por otro lado, se realizó la determinación de humedad por gravimetría.

7.3 Determinación de la actividad proteasa y nitrogenasa en las muestras de suelo.

La actividad proteasa fue medida de acuerdo a Ladd & Butler (1972); 0.1 g de suelo fueron incubados 2 horas a 50 °C, utilizando caseína como sustrato en condiciones alcalinas (Buffer Tris pH 8.1). Posteriormente, los aminoácidos liberados durante la incubación se midieron colorimétricamente a 700 nm utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu. Para hallar la concentración de aminoácidos liberados por la actividad enzimática en la muestra, se construyó una curva estándar con tirosina. Cada una de las muestras, fue valorada cinco veces y además se analizaron dos blancos de reacción (muestras incubadas sin sustrato), por cada muestra de suelo.

La actividad nitrogenasa del suelo se determinó por la prueba de reducción de acetileno, según lo sugerido por Lozano (1998), para el ensayo 1 mL de la dilución 10^{-3} de las muestras de suelo, fue sembrada por triplicado en frascos que contenían 9 mL de Agar NFB semisólido. Las muestras fueron incubadas por 24 horas a 30 °C, luego de las cuales el 10% de la atmósfera del frasco fue sustituida por acetileno, y se incubaron nuevamente por 24 horas a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, la cantidad de etileno producido fue determinado por cromatografía de gases. La determinación de la actividad enzimática se realizó por triplicado para cada finca, los resultados son expresados como nmoles de etileno por gramo de suelo seco en 24 horas.

7.4 Estimación de la abundancia de grupos funcionales de microorganismos cultivables asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno.

Preliminar a la estimación de grupos funcionales de microorganismos, con el propósito de realizar una estimación general de la población cultivable de los suelos de estudio, se realizó un recuento total de bacterias en Agar Nutritivo (OXOID®), para lo cual se sembraron por triplicado 100 µL de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} de suelo por extensión en placa en el medio de cultivo, que posteriormente fue incubado a 25°C por 24 horas.

Por otro lado, para el recuento de fijadores biológicos de nitrógeno, las muestras de suelo fueron analizadas por triplicado, mediante la técnica de recuento de células viables por extensión en placa en Agar NFB (Rennie, 1989) modificado (componentes por litro: ácido málico 5 g, K_2HPO_4 0,5 g, NaCl 0,1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ 0.02 g, azul de bromotimol 0.05 g, KOH, 2 g, manitol 8 g, glucosa 8 g, solución de micronutrientes 2 mL, solución Fe – EDTA 4 mL, solución de vitaminas 1 mL), el cual fue ajustado a un pH 7.0 y solidificado con agar al 1.5%. Cada caja de petri, fue inoculada con 100 µL de una dilución de la muestra de suelo en solución salina (NaCl 0.85%). Posteriormente, las cajas sembradas fueron incubadas a 30°C por 5 días.

La estimación de la abundancia de microorganismos proteolíticos (PR), amonificantes (AMO), oxidadores de amonio (BOA), oxidadores de nitrito (BON) y denitrificantes (DEN), se realizó por el método de Número Más Probable según lo sugerido por Pochon & Tardieux (1962) con algunas modificaciones. Brevemente, los medios de cultivos fueron preparados utilizando como base la solución salina de Winogradsky (Pochon & Tardieux, 1962) a razón de $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ y suplementados con una solución de oligoelementos ($1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$). Se utilizaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno según el grupo de interés. Así, para los microorganismos PR se utilizó gelatina ($30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como única fuente de carbono y nitrógeno, mientras que para los organismos AMO se utilizó L- asparagina ($0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$); asimismo, para los BOA y BON se utilizó carbonato de calcio ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como fuente de carbono y sulfato de amonio ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) y nitrito de sodio ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) respectivamente como fuente de nitrógeno; de otro lado, los microorganismos denitrificantes fueron crecidos en un medio con nitrato de potasio ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) y acetato de sodio ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para realizar el recuento, tubos que contenían 9 mL de medio fueron inoculados por triplicado con 1 mL de dilución de las muestras de suelo (tres tubos por cada dilución). Los

tubos fueron incubados a 30°C por 15 días para los PR, AMO, DEN y 30 días para los BOA y BON.

Posteriormente, para estimar el número de organismos presentes, se determinó la presencia/ausencia de estos organismos utilizando como características la licuefacción de la gelatina (PR), Bach & Munch (2000), producción de amonio determinada por el reactivo de Nessler (AMO), Amora – Lazcano *et al.* (1998), la producción de nitrito medida con el reactivo de Griess Ilosvay (BOA), el consumo de nitrito determinado con el reactivo de Griess Ilosvay (BON), Alexander & Clark (1965) y la producción de gas determinada con la utilización de campanas de Durham (DEN) Horiba *et al.* (2005). El número más probable de microorganismos fue calculado utilizando las tablas de Mc Crady (1918). Los conteos fueron expresados como número más probable de microorganismos por gramo de suelo seco.

7.5 Amplificación y secuenciación del gen 16s rRNA de organismos fijadores de nitrógeno aislados del recuento en placa

Una vez realizados los conteos de los microorganismos fijadores de nitrógeno que crecieron en Agar NFB, se procedió a su posterior purificación y criopreservación a -80°C en Caldo NFB con Glicerol al 15%. Adicionalmente, se realizó la extracción del DNA genómico de cada aislamiento por el método de CTAB Fenol-Cloroformo (Ausubel *et al.*, 2003). Posteriormente, se realizó la amplificación del gen 16s rRNA utilizando los primers universales 27f y 1492r (Martin-Laurent *et al.*, 2001). La reacción de PCR (50 µL) contenía 5µL de buffer PCR 10X, 1.5 µL de MgCl₂ 50mM, 2µL de dNTP 20mM, 1µL de cada primer 20µM, 2µL de templado de ADN y 0.4µL de Taq polimerasa (5U/µL). Para la amplificación se utilizó el perfil descrito a continuación: una denaturación inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 45 seg a 55°C, 1 min a 72°C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación del gen 16s rRNA, fueron secuenciados por MacroGen (MacroGen Inc, Korea) en el secuenciador ABI 3730xl DNA Analyzer, en los dos sentidos utilizando los primers universales 27F y 1492R respectivamente. Posteriormente, las secuencias fueron analizadas utilizando la herramienta *SeqMatch* del Ribosomal Database Project (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp), con el propósito de realizar la asignación taxonómica de las mismas.

7.6 Extracción de ácidos nucleicos, amplificación y secuenciación del 16s rRNA de la comunidad.

Los procedimientos descritos a continuación, desarrollados para la descripción de la comunidad de microorganismos mediante una estrategia de secuenciación masiva, fue desarrollada por Corpogen, quienes son integrantes del Consorcio de Investigación en Metagenómica de Suelos Agrícolas (CIMA), en el marco del macroproyecto “*Estudio de Microorganismos y Metabolismo Edáfico para Contribuir con una Agricultura de Precisión en Papa Criolla*”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y CENICAFÉ, y dentro del cual se articula el presente trabajo.

Dados los costos de la implementación de esta metodología, sólo fueron seleccionadas muestras de suelo de cuatro fincas; por lo cual, fue necesario realizar una selección de dos de las cinco muestras de suelo de las fincas de manejo tradicional, las cuales fueran similares en sus propiedades físico-químicas a las de manejo orgánico, con el objeto de permitirnos la comparación de los diferentes “sets” de datos, en relación al manejo agrícola.

Para el análisis, el DNA del suelo fue extraído de las 4 muestras de estudio utilizando el kit Power Soil TM DNA (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, a partir del DNA extraído, las regiones hipervariables V5 y V6 del gen 16s rRNA fueron amplificadas utilizando los primers 807F (5'-GGATTAGATACCCBRGTAGTC-3') y 1050R (5'-AGYTGDCGACRRCRTGC-3') propuestos por Sogin *et al.* (2006), con algunas modificaciones propuestas por miembros del consorcio de investigación. La reacción de PCR contenía 2.5U de Pfu Turbo polimerasa y 1X de buffer de reacción Pfu (Stratagene, La Jolla, CA, USA), 0.6 mM dNTPs, 0,75 uM de cada primer, 5% v/v DMSO y de 2 a 8 ng DNA extraído para un volumen final de 25 uL. El programa de amplificación consistía en una denaturación inicial por 2 min a 95°C, seguida por 30 ciclos de touch-down de 60°C a 51°C (0.33°C/ciclo) y una extensión por 1 min a 72°C, un paso de extensión final por 5 min a 72°C fue aplicado para asegurarse de la completa amplificación de la región blanco. Se empleó DNA de *Escherichia coli* como control positivo.

Cada producto de PCR fue usado en una dilución 1:10 como molde para una nueva PCR para agregar los primers de pirosecuenciación, que contenían los adaptadores para la pirosecuenciación y el respectivo “barcode” específico para cada suelo analizado. La mezcla de

amplificación, contenía las mismas condiciones de la PCR descrita anteriormente, excepto por la temperatura y ciclos (5 ciclos a 53°C). Posteriormente, los productos de PCR fueron limpiados de los excesos de enzima, dNTPs y primers usando el kit QIAquick® (QIAGEN, Valencia, CA, USA) acorde a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron posteriormente secuenciadas utilizando el sistema de pirosecuenciación de Roche Diagnostics 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX (Indianapolis, IN, USA), en la Environmental Genomics Core Facility de la University of South Carolina (Columbia, SC, USA). La pirosecuenciación fue desarrollada usando únicamente el primer reverse, el cual cubre la mayoría de la región hipervariable V6 del fragmento del gen 16s rRNA.

7.7 Análisis y Limpieza de Secuencias obtenidas mediante pirosecuenciación.

Al igual que el apartado anterior, este proceso fue llevado a cabo por Corpogen, en el marco de su participación en el Consorcio de Investigación en Metagenómica de Suelos Agrícolas (CIMA). Los datos generados de la pirosecuenciación fueron procesados en el sitio para análisis de diversidad de la Red Nacional para Investigación de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos— GeBiX (http://www.gebix.org.co/gbx_diversity/) GeBiX Diversity; y usando estas herramientas, las secuencias fueron asignadas dentro de las 4 muestras analizadas, en base el respectivo “barcode” asignado a cada una de ellas. Después de la separación en grupos, a las secuencias se les fueron retiradas las porciones de secuencia correspondientes a los adaptadores de secuenciación, el “barcode” y los primers de secuenciación. Asimismo, para minimizar el sesgo de errores de secuenciación aleatorios, las secuencias menores de 50 nucleótidos, regiones de baja calidad con Q-values menores de 20 y con una o más bases ambiguas (N), fueron excluidas para posteriores análisis. Por último, la identidad taxonómica de cada filotipo fue determinada a nivel de género usando la herramienta *Classifier* del Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) usando un umbral de bootstrap del 80% (Wang *et al.*, 2007).

7.8 Asignación funcional de los ribotipos, asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno.

Con el propósito de identificar cual es la representación de los géneros de microorganismos asociados a diferentes procesos del ciclo del nitrógeno (fijación de nitrógeno, nitrificación, denitrificación y reducción desasimilativa de nitrato a amonio), se analizaron los resultados del ribotipaje, en relación con géneros de microorganismos asociados a cada función reportados en la literatura (Sylvia *et al.* 2005; Tiedje 1988; Taske *et al.*, 1994; Young, 1992; Behar *et al.*, 2005; Chelius & Triplett, 2000; Chen *et al.*, 2003; Malik *et al.*, 1997; Zakhia *et al.*, 2006). Esta revisión permitió identificar alrededor de 140 géneros de microorganismos asociados a dichos procesos (Anexo 2), dado que algunos géneros de microorganismos han sido asociados a más de un proceso, estos fueron considerados para ambos procesos. Adicionalmente, se estimó la proporción de representación de cada género en relación al número total de secuencias de buena calidad obtenidos para cada finca y el porcentaje acumulado de ribotipos (secuencias asignadas) para cada función, con el propósito de identificar la capacidad potencial de dicho suelo de soportar cada proceso en relación a la abundancia de individuos que se sabe son capaces de participar en ellos.

7.9 Análisis estadístico

Los datos de recuentos de microorganismos fueron expresados en logaritmo, y posteriormente se realizó una prueba de descomposición de varianza para la abundancia de cada grupo. A partir de esto, para verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre dichos resultados dadas las características del conjunto de datos; se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (KW) por pares. Para el análisis de los resultados de las actividades enzimáticas se realizó el test de Tukey. Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación entre las variables de estudio y finalmente para probar si las diferencias en la proporción de grupos de microorganismos obtenidas de la pirosecuenciación eran significativas, se realizó un test Z para análisis de proporciones. Los análisis descritos, fueron realizados utilizando el programa estadístico STATA 9.0. (StataCorp, 2005), a un valor de significancia $P = 0.05$.

Además, se realizaron análisis multivariados con las variables físico – químicas y microbiológicas determinadas, como el análisis de componentes principales en el programa estadístico R project. (R Development Core Team, 2008). De igual forma, en el programa estadístico STATA 9.0. (StataCorp, 2005) se realizó un análisis de clusters jerárquico, utilizando como criterio de agrupación el promedio de las distancias entre todos los pares de variables incluidas en el análisis.

8. RESULTADOS

8.1 Propiedades físico-químicas de los suelos de estudio

La Tabla 1 presenta los resultados del análisis físico – químico y otras características importantes de las muestras de estudio; en general se encuentran diferencias en el contenido de carbón orgánico, nitrógeno total y humedad marcadas entre fincas, independientes del manejo agrícola. Adicionalmente, se observa que el pH varía de moderadamente ácido a fuertemente ácido, siendo mayor el de las fincas de manejo orgánico. En relación a la textura, se observa que los suelos de estas fincas varía desde arcilloso a franco-arcilloso. Cabe resaltar, que se observan menores concentraciones de amonio y nitrato para las fincas de manejo orgánico, las cuales a excepción de lo observado para la finca 1, presentan los mayores contenidos de nitrógeno total y calcio. Igualmente, otras características distintivas entre fincas de manejo orgánico y manejo tradicional observadas, son la concentración de sodio (mayor en las fincas de manejo orgánico) y hierro (mayor en las fincas de manejo tradicional).

Tabla 1. Análisis físico – químico de los suelos de estudio.

	Producción	% H	pH	CO	Ca	K	Mg	Na	CIC	P	Cu	Fe	Mn	Zn	Ar	L	A	NT	NH ₄	NO ₃
Finca 1 San Isidro	23.38	79.10	5.6	14.5	22.2	1.44	3.34	0.28	69.3	11.7	1.43	170	3.01	3.57	10	39	51	1.08	24.5	43.0
Finca 2 Los Pinos	17.85	37.84	5.3	6.47	7.82	0.56	2.01	0.29	30.1	116	0.73	334	2.49	4.84	26	30	44	0.41	17.1	14.4
Finca 3 La Isla	18.50	40.51	4.9	7.38	7.69	2.49	3.89	0.22	28.9	116	0.97	471	4.1	5.8	24	28	48	0.52	29.5	39.4
Finca 4 Cascajal	14.50	52.81	5.5	12.9	6.06	1.8	1.78	0.12	42.7	73.7	0.82	182	1.98	6.83	15	35	49	0.59	31.2	12.7
Finca 5 La Isla II	16.80	29.38	5.3	6.2	6.34	2.51	3.33	0.2	22.6	107	0.83	523	2.41	5.01	31	33	35	0.39	26.1	32.6
Finca 6 Montaña Pura	ND	80.01	5.7	13.3	13.2	2.25	4.18	0.51	48.2	69.8	1.29	105	3.94	6.79	6	19	75	0.93	11.1	15.5
Finca 7 El Volcán	ND	62.33	6.0	9.74	11.4	1.64	3.13	0.38	43.8	49.8	0.88	97	2.89	2.71	6	27	67	0.62	11.7	7.94

ND: No determinado

Producción: Bultos por Bultos de Siembra, %H: Porcentaje de Humedad, CO: Porcentaje de carbón orgánico, Ca: Calcio (meq· 100 g⁻¹), K: Potasio (meq· 100 g⁻¹), Mg: Magnesio (meq· 100 g⁻¹), Na: Sodio (meq· 100 g⁻¹), CIC: capacidad de intercambio catiónico (meq· 100 g⁻¹), P: Fósforo (mg · Kg⁻¹), Cu: Cobre (mg · Kg⁻¹), Fe: Hierro (mg · Kg⁻¹), Mn: Manganeseo (mg · Kg⁻¹), Ar: Porcentaje de Arcilla, L: Porcentaje de Limo, A: Porcentaje de Arena, NT: Porcentaje de nitrógeno total , NH₄: Amonio (mg · Kg⁻¹) y NO₃: Nitrato (mg · Kg⁻¹).

Con el propósito de verificar las similitudes/diferencias de las fincas, en términos de sus propiedades físico-químicas, se realizó un análisis de clusters jerárquico (Figura 4), en el cual se observa cómo las fincas 6 y 7 (de manejo orgánico) son las más similares entre sí y a su vez son cercanas a las fincas 1 y 4 (ambas de manejo tradicional) que son agrupadas en un mismo cluster. Además se observa, que estas cuatro fincas, se separan de las demás fincas de manejo tradicional, en las que se evidencia que las fincas 3 y 5 son similares entre sí, mientras que, la finca 2 es la que mayores diferencias presenta con las demás fincas consideradas en el estudio. Es importante resaltar, que esta agrupación presenta un comportamiento coherente con los contenidos de carbón orgánico de cada finca.

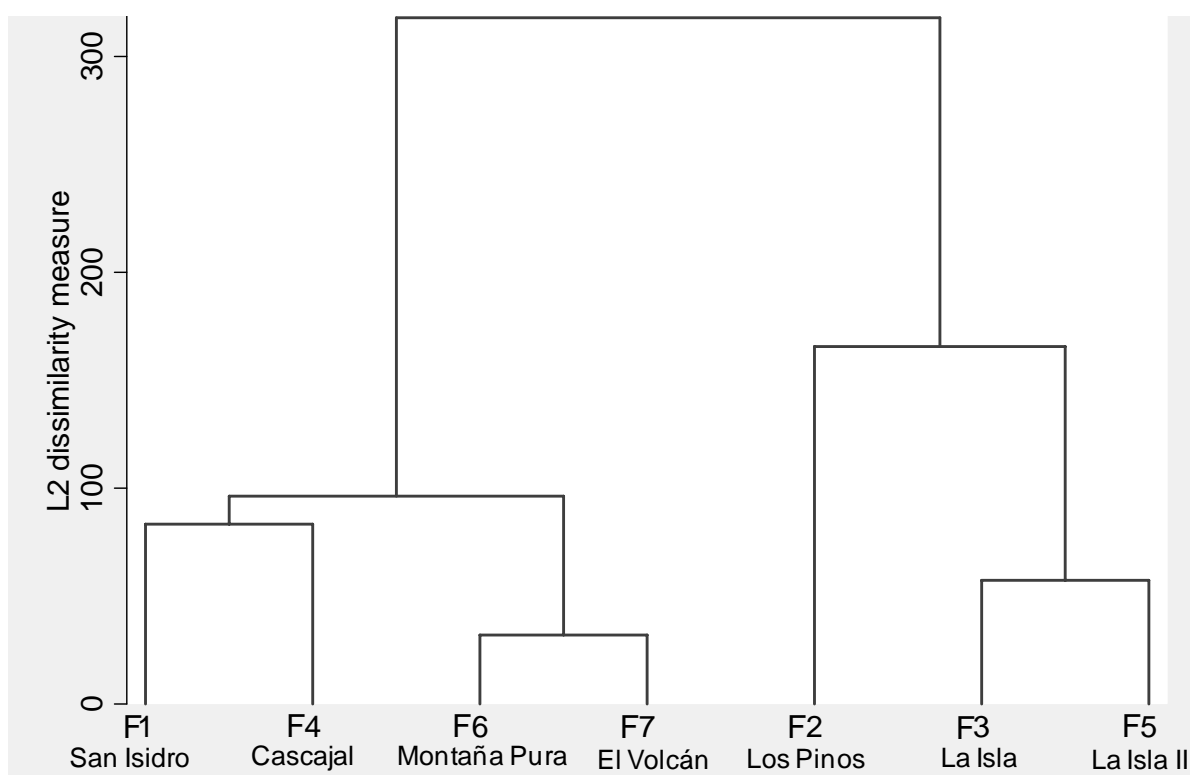


Figura 4. Análisis jerárquico de clusters para los suelos de estudio, en relación a las variables físico-químicas evaluadas.

8.2 Estimación de la abundancia de grupos funcionales de microorganismos cultivables asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno y su relación con algunas propiedades físico-químicas del suelo.

La Figura 5, presenta los resultados del recuento total de bacterias en Agar Nutritivo, el cual fue realizado con el propósito de realizar un diagnóstico general del estado de las comunidades edáficas cultivables en los suelos de estudio. El análisis estadístico de dichos datos, refleja que hay diferencias estadísticamente significativas para las siete fincas. Así, se destaca la finca 4, con los mayores recuentos estadísticamente diferentes al resto, seguida de la finca 1, mientras que, para las fincas 3, 5, y 6, el recuento total bacteriano es intermedio, y no presenta diferencias estadísticas entre sí, mientras que las fincas 2 y 7 son las que presentan recuentos significativamente menores, aunque estadísticamente iguales a los de las fincas 3, 5 y 7.

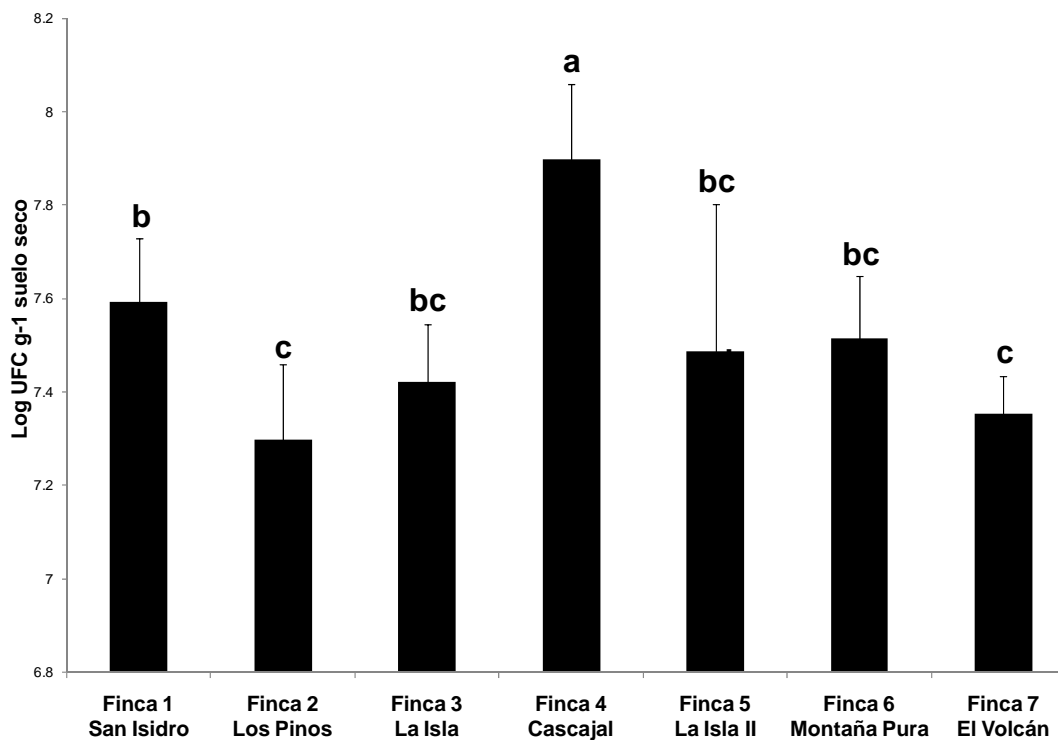


Figura 5. Recuento de total de bacterias en Agar Nutritivo. Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí de acuerdo con el test por pares de Kruskal Wallis a un $P = 0.05$. Las barras de error mostradas corresponden a barras de desviación estándar para cada conjunto de datos.

Cabe resaltar, que para el recuento total bacteriano no se encontró ninguna relación entre la abundancia de estos microorganismos y los parámetros físico-químicos del suelo. Sin embargo, el análisis podría sugerir una influencia del contenido de materia orgánica sobre las poblaciones totales cultivables, ya que las fincas con mayor contenido de materia orgánica (4 y 1), son las que presentan los mayores recuentos, mientras que, las fincas 2, 7 y 5, que para el rango de fincas muestreadas presenta menores contenidos de materia orgánica, corresponden a las fincas con menores recuentos. Sin embargo, dicha observación no se cumple para la finca 6, la cual a pesar de presentar altos contenidos de materia orgánica, no se agrupa con las fincas de mayor recuento, lo cual podría sugerir que existen otros factores que están influenciando la abundancia de microorganismos cultivables en el suelo de esta finca.

Los resultados de los recuentos de microorganismos fijadores de nitrógeno son presentados en la Figura 6, se observan los mayores recuentos en las fincas de manejo tradicional 3, 4, y 5; seguidos de los recuentos de la finca 2, la cual presenta valores intermedios, mientras que las y las fincas 6 y 7 de manejo orgánico, presentan los menores recuentos. De otro lado, al analizar la abundancia de este grupo en relación con variables físico-químicas del suelo, a una significancia del 5% se observó correlación positiva con la concentración de amonio (0.8650), mientras que hubo correlación negativa con la concentración de arena (-0.9174) y sodio (-0.9361). Asimismo, a una significancia del 10%, se observaron relaciones positivas con la concentración de limo (0.7178), arcilla (0.7605) y hierro (0.6858); además de relaciones negativas con el pH (-0.7363) y porcentaje de humedad (-0.7006).

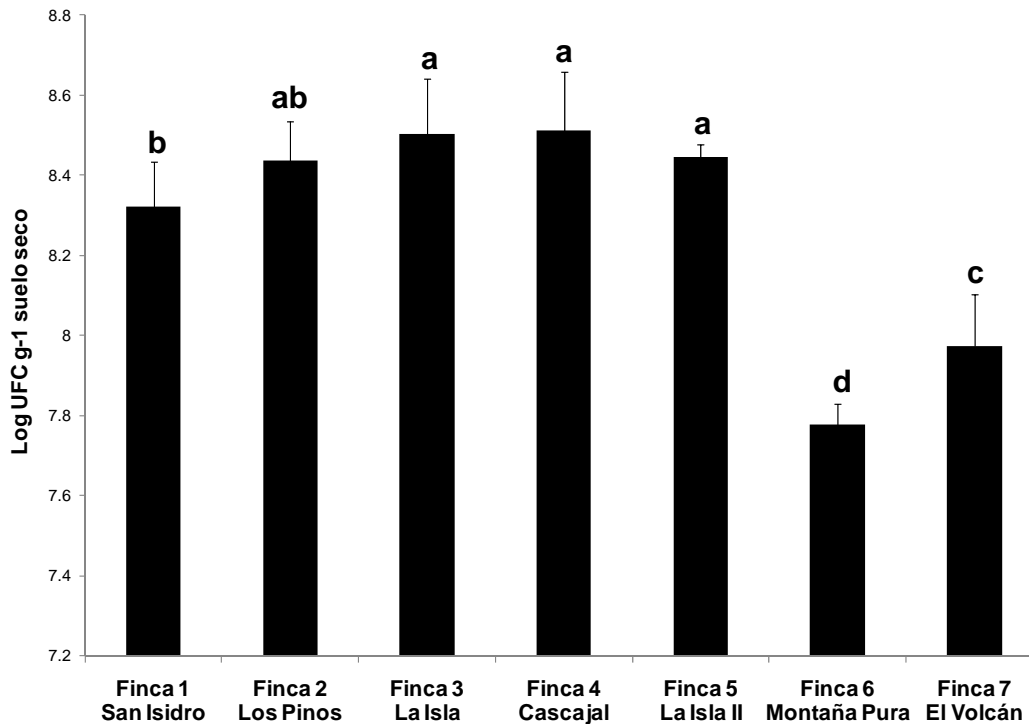


Figura 6. Recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno en Agar NFB. Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí de acuerdo con el test por pares de Kruskal Wallis a un $P = 0.05$. Las barras de error mostradas corresponden a barras de desviación estándar para cada conjunto de datos.

De otro lado, los recuentos de los otros grupos asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno (Tabla 2), muestran diferencias significativas entre fincas para todos los grupos, a excepción de los microorganismos proteolíticos los cuales no presentan diferencias estadísticas entre fincas. En cuanto a los microorganismos denitrificantes, se destaca la finca 6 de manejo orgánico la cual presentó el menor recuento, además, las fincas 2, 3 y 7 presentaron recuentos intermedios seguidos de las fincas 1, 4 y 5 todas de manejo tradicional que presentaron los mayores recuentos. Respecto a los demás grupos funcionales, se destaca que los recuentos de los microorganismos PR y AMO, fueron cercanos a tres órdenes de magnitud (entre 2×10^7 y 4×10^8 nmp g⁻¹ suelo seco) mayores a los de los BOA y BON (que oscilaron entre 1.5×10^2 y 8×10^3 nmp g⁻¹ suelo seco).

Tabla 2. Número más probable de algunos microorganismos asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno. Se presenta el promedio de tres réplicas para el recuento de cada grupo funcional, expresado como nmp g⁻¹ suelo seco. Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí de acuerdo con el test por pares de Kruskal Wallis a un P = 0.05.

	Proteolíticos	Amonificantes	Oxidadores de Amonio	Oxidadores de Nitrito	Denitrificantes
Finca 1 San Isidro	4.12 x 10 ⁸ a	7.10 x 10 ⁸ a	1.15 x 10 ² a	1.58 x 10 ⁴ a	> 2.51 x 10 ⁶
Finca 2 Los Pinos	2.62 x 10 ⁸ a	2.39 x 10 ⁸ ab	2.08 x 10 ² ab	9.19 x 10 ³ a	9.28 x 10 ⁵ a
Finca 3 La Isla	2.81 x 10 ⁸ a	4.45 x 10 ⁷ b	9.65 x 10 ¹ ab	> 1.97 x 10 ⁴	9.46 x 10 ⁵ a
Finca 4 Cascajal	2.85 x 10 ⁸ a	1.63 x 10 ⁸ ab	1.02 x 10 ⁴ c	8.90 x 10 ⁴ c	> 2.14 x 10 ⁶
Finca 5 La Isla II	2.26 x 10 ⁸ a	1.14 x 10 ⁸ ab	5.43 x 10 ¹ abc	7.55 x 10 ³ ab	> 1.81 x 10 ⁶
Finca 6 Montaña Pura	2.84 x 10 ⁸ a	9.97 x 10 ⁶ c	6.99 x 10 ² ab	1.79 x 10 ³ b	2.44 x 10 ² b
Finca 7 El Volcán	2.30 x 10 ⁸ a	1.46 x 10 ⁸ ab	2.00 x 10 ² b	6.98 x 10 ³ abc	1.33 x 10 ⁶ a

El análisis de la relación existente entre la abundancia de los diferentes grupos funcionales y otras características de las muestras de suelo incluyendo variables físico – químicas y de producción, mostró una relación positiva de los microorganismos proteolíticos a una significancia del 5% con producción (0.9236), humedad (0.8255), capacidad de intercambio catiónico (0.9394), cobre (0.8435) y nitrógeno total (0.8992), así como una relación negativa de este grupo al mismo nivel de significancia con el fósforo (-0.8840); además, a una significancia del 10% se destaca la relación de este grupo con el porcentaje de carbón orgánico (0.7491). Por otro lado, los demás grupos funcionales no presentan relaciones estadísticas significativas.

8.3 Determinación de las actividades enzimáticas

Respecto a las actividades enzimáticas se observan diferencias entre las fincas, destacándose para el caso de la actividad proteasa (Figura 7) las fincas 1 y 6 (de manejo tradicional y orgánico respectivamente), quienes presentan las mayores actividades. Cabe resaltar igualmente, que estas se caracterizan por tener los mayores niveles de carbón orgánico y nitrógeno total (Tabla 1). Cabe resaltar, que la actividad nitrogenasa (Figura 8), no presentó relación con la abundancia de microorganismos fijadores biológicos de nitrógeno, ya que al analizar los datos en conjunto es interesante que la finca 6 aún teniendo la mayor actividad enzimática, es la que presenta los menores recuentos para fijadores, mientras que, para el caso de la finca 3, esta ocupa el segundo lugar tanto en actividad nitrogenasa como en recuento de fijadores.

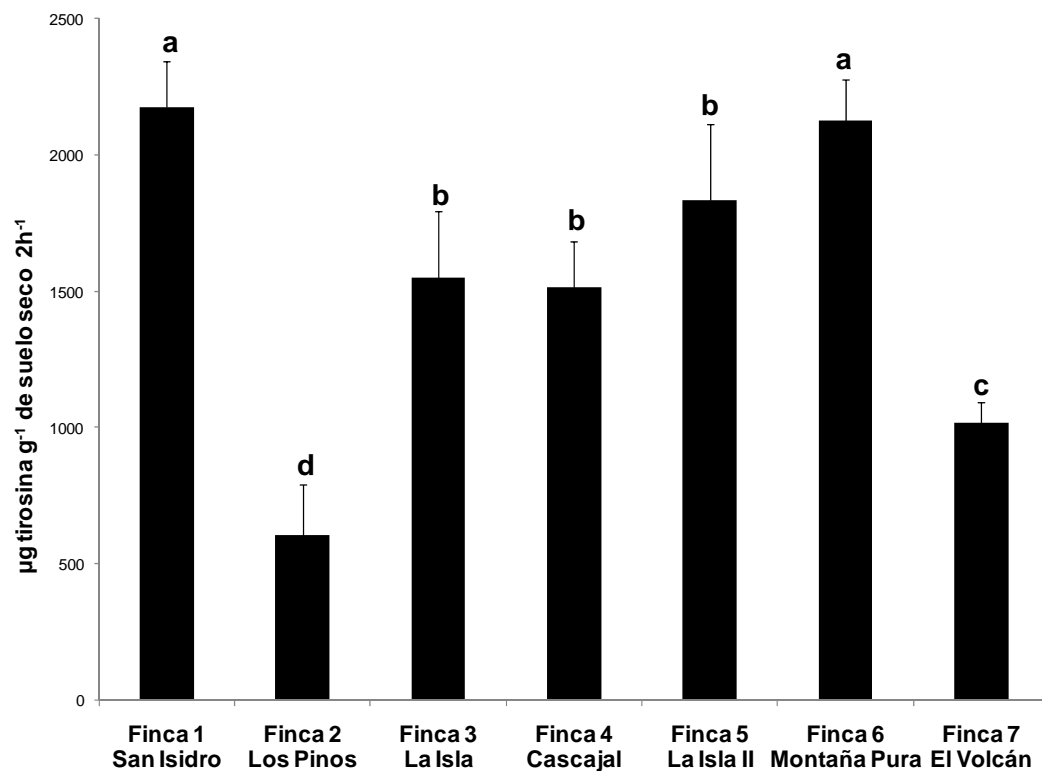


Figura 7. Actividad Proteasa. Las barras corresponden al promedio de la actividad, expresada en µg de tirosina por gramo de suelo seco en 2h⁻¹. Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre si de acuerdo con el test Tukey a un P= 0.05. Las barras de error mostradas corresponden a barras de desviación estándar para cada conjunto de datos.

En cuanto a la relación de estas determinaciones bioquímicas del suelo (actividad proteasa y nitrogenasa) con los otros descriptores de estudio, se observa una relación negativa, significativa al 5% de la actividad nitrogenasa, con las bacterias amonificantes (-0.9018); pero, positivas con el magnesio (0.6734) y manganeso (0.8802) a un 10 y 5 % de significancia respectivamente. Por su parte, la actividad proteasa muestra una relación positiva con el cobre (0.7839) significativa al 5%.

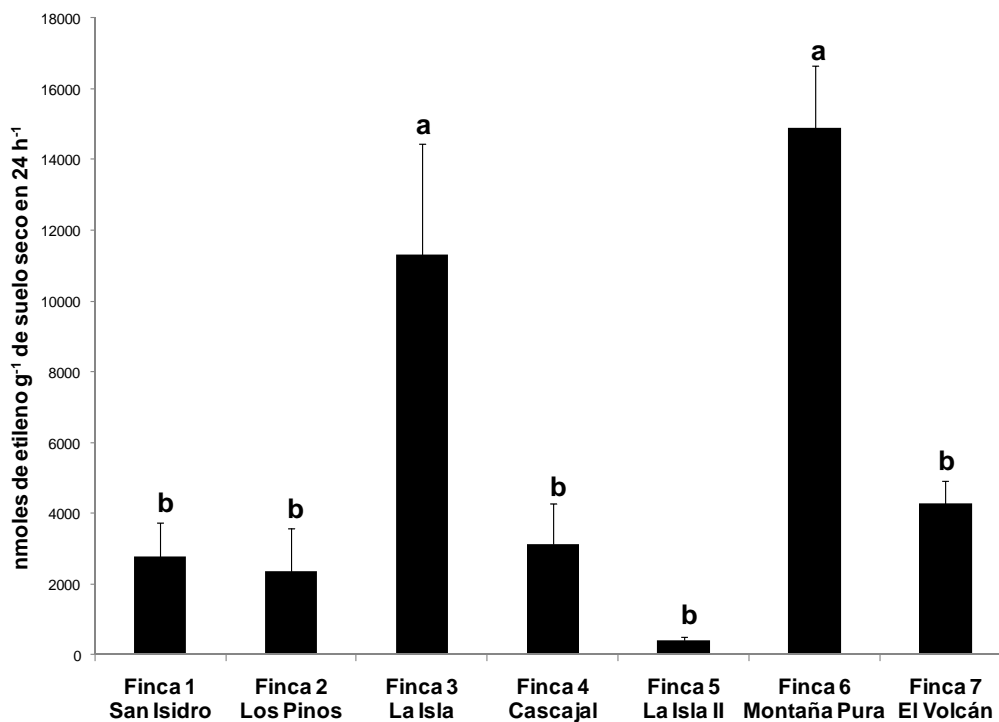


Figura 8. Actividad Nitrogenasa. Las barras corresponden al promedio de la actividad, expresada en nmoles de etileno por gr de suelo seco en 24 horas. Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí de acuerdo con el test Tukey a un $P = 0.05$. Las barras de error mostradas corresponden a barras de desviación estándar para cada conjunto de datos.

Una vez analizadas las variables por separado, un análisis multivariado, como el de componentes principales fue utilizado, según lo sugerido por (Goloboanin, 2004) para reducir el número original de variables (físico – químicas, microbiológicas y enzimáticas) y extraer un pequeño número de factores latentes, para analizar relaciones entre las variables observadas. Las Figura 9 representa los análisis de componentes principales en los que mejor se describió la variación del conjunto de datos.

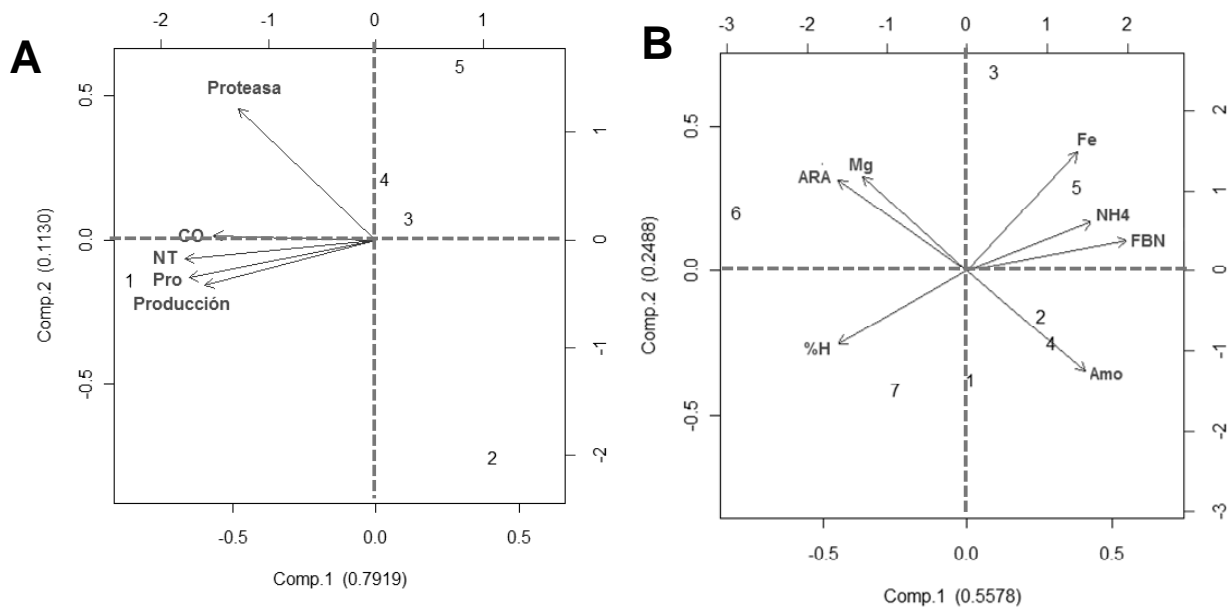


Figura 9. Análisis de componentes principales. Para el análisis, se utilizó el dato promedio para cada variable determinada en el laboratorio. Las variables representadas corresponden a: **A.** Proteasa: Actividad proteasa, CO; Carbón Orgánico, NT: Nitrógeno Total, Pro: Proteolíticos, Producción: Producción de las fincas. **B.** ARA: Actividad Nitrogenasa, Mg; Magnesio, %H: Porcentaje de Humedad, Amo: Amonificantes, FBN: Fijadores Biológicos de Nitrógeno, NH4: Amonio, Fe: Hierro.

8. 4 Análisis de secuencias del gen 16s rRNA (ribotipaje).

Como se había mencionada anteriormente, los datos y análisis generales presentados a continuación, fueron obtenidos por diferentes miembros (García *et al.*, 2009) del Consorcio de Investigación en Metagenómica de Suelos Agrícolas (CIMA), mientras que los análisis correspondientes fueron desarrollados durante el desarrollo del presente trabajo. En la Tabla 3, se presenta un resumen de las características de los diferentes “sets” de datos para cada finca. En general, se observa que el porcentaje de secuencias de buena calidad (que cumplen con los parámetros descritos en la sección 5.7) respecto a el número total de lecturas obtenidas, fue similar para las cuatro muestras de suelo analizadas; se destaca la finca 1 con un 91.5% de secuencias de buena calidad, además de las fincas 6 y 7 que presentaron porcentajes cercanos entre sí (88.1 y 88.7%), mientras que la finca 4, presentó el menor porcentaje de secuencias de buena calidad con un 85.7%. Además, se puede evidenciar que las

proporciones de secuencias únicas y de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) respecto al número total de secuencias de buena calidad, presentan el mismo comportamiento, son similares para las fincas de manejo tradicional 1 y 4, pero diferentes en relación a las fincas 6 y 7 de manejo orgánico.

Tabla 3. Características generales del conjunto de datos de las muestras analizadas por pirosecuenciación. Modificada a partir de García *et al.* (2009)

	Lecturas	Secuencias de buena calidad*	Secuencias Únicas	OTUs**	Recuento Agar Nutritivo
Finca 1 San Isidro	7092	6490	5770 a	4701 a	4.08 x 10 ⁷ b
Finca 4 Cascajal	12627	10823	9653 a	7793 a	8.35 x 10 ⁷ a
Finca 6 Montaña Pura	3538	3118	2904 b	2541 b	3.39 x 10 ⁷ bc
Finca 7 El Volcán	4558	4044	3133 c	2793 c	2.29 x 10 ⁷ c

*Mayores a 50 nucleótidos, Q-values mayores de 20 y menos de un nucleótido ambiguo (N).

** OTUs definidos a un 97% de similitud utilizando la herramienta DOTUR (Schloss *et al.*, 2005)

Es importante resaltar, que si bien la finca 6 presenta la menor cantidad de OTUs, al comparar dicho resultado en términos relativos (según el número de secuencias de buena calidad obtenidos para cada finca) está presente la mayor proporción con un 81.4%, seguida de las fincas 1 y 4 las cuales presentan proporciones del 72.4% y 72.0% respectivamente, por su parte, la finca 7 presentó la menor proporción de OTUs con un 69.1%. Además, estimaciones de los índices de diversidad de ACE y Chao1, realizados por otros miembros del consorcio de investigación (García *et al.*, 2009), a los suelos de estudio a diferentes niveles de disimilaridad (1%, 3%, y 5%), mostraron que las fincas 1 y 4 (tradicionales), presentan mayor riqueza que las fincas 6 y 7 (Orgánicas).

Una observación importante que surge del análisis de estos datos, es que con excepción de la finca 6, hay cierta correspondencia entre el número de OTUs y los recuentos totales de bacterias cultivables realizados (mayores para la finca 1, seguido de las fincas 4 y 7). Esto podría sugerir que si bien es cierto que estas dos aproximaciones arrojan resultados a diferentes niveles de profundidad, la visualización general de la comunidad parece ser equivalente.

Además, con el propósito de dar una mirada general a la estructura de la comunidad microbiana, mediante los datos generados de la secuenciación masiva de las regiones V5-V6, se analizó la proporción de cada uno de los “phylum” de archeas y eubacterias presentes en cada muestra de suelo, en relación a la cantidad de secuencias de buena calidad obtenidas para cada finca. De esta manera, la Tabla 4 presenta las proporciones de cada phylum para las cuatro muestras de suelo analizadas; se observa que la proporción de los dominos bacteria y archaea fue diferente para los suelos de estudio, independiente del manejo agrícola. El phylum del dominio archaea con mayor representación es *Crenarchaeota*, mientras que para el dominio bacteria, se resaltan como los más abundantes los phylum *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia*.

Continuando con el análisis, al relacionar la proporción de dichos grupos de microorganismos y el manejo agrícola de los suelos de estudio, se resalta que al analizar la proporción de “phylum” de los dominios bacteria y archaea, el único que presentó proporciones iguales para las fincas de manejo orgánico y significativamente diferentes (menores) a las proporciones de las fincas de manejo tradicional fue el “phylum” *Planctomycetes*. La proporción de los demás “phylum” analizados no presento diferencias estadísticas significativas que agrupen a las fincas en función del manejo agrícola (Tabla 4). Además, se resalta que existe una mayor cantidad de phylum presentes en las muestras de cultivos con manejo orgánico, dentro de los cuales se destacan *Spirochaetes*, *Deinococcus – Thermus*, *Thermotogae* y *Cyanobacteria*, los cuales aunque en bajas proporciones, fueron detectados exclusivamente en este tipo de fincas.

Otro hallazgo interesante, es la proporción de secuencias relativamente alta para las cuatro fincas que no pudo ser asignada (entre el 4.7% y 6.4%), la cual a su vez separa claramente los suelos de estudio en función del manejo agrícola, lo que podría indicar que aún existe una proporción significativa de organismos desconocidos, que podrían ser importantes para la identificación de cambios en la estructura de las comunidades microbianas como consecuencia del manejo agrícola. Sin embargo, la proporción de secuencias desconocidas asignada al dominio bacteria es mucho mayor a las pertenecientes al dominio archaea, lo cual es similar a lo observado en el número total de secuencias asignado para cada dominio, indicando una mayor proporción de organismos pertenecientes al dominio bacteria, que al dominio archaea.

Tabla 4. Asignación taxonómica de los ribotipos a nivel de phylum. Los datos presentados corresponden a la proporción de cada phylum o dominio, en relación con las secuencias de buena calidad obtenidas para cada finca. Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí de acuerdo con el test Z para proporciones a un P = 0.05.

	Finca 1 San Isidro	Finca 4 Cascajal	Finca 6 Montaña Pura	Finca 7 El Volcán
Dominio Archea	2.10 c	6.59 a	2.05 c	4.88 b
<i>Phylum Euryarcheota</i>	0.05 b	0.11 b	0.03 b	0.32 a
<i>Phylum Crenarchaeota</i>	1.50 b	3.72 a	1.28 b	3.34 a
Sin Clasificar Archea	0.54 ac	2.76 a	0.74 bc	1.22 b
Dominio Bacteria	91.47 b	87.23 c	93.26 a	90.73 b
<i>Phylum Cyanobacteria</i>	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.02 a
<i>Phylum OD1</i>	0.03 a	0.01 a	0.06 a	0.05 a
<i>Phylum Chlamydiae</i>	0.11 a	0.09 a	0.13 a	0.15 a
<i>Phylum WS3</i>	0.12 ab	0.03 a	0.03 b	0.00 ab
<i>Phylum Firmicutes</i>	0.45 a	0.23 ab	0.19 ab	0.15 b
<i>Phylum OP10</i>	0.12 a	0.03 a	0.13 a	0.02 a
<i>Phylum Bacteroidetes</i>	2.45 b	2.08 c	6.64 a	2.96 b
<i>Phylum Planctomycetes</i>	2.27 c	3.45 b	4.75 a	5.13 a
<i>Phylum Actinobacteria</i>	6.48 a	3.81 b	3.21 b	3.89 b
<i>Phylum Chloroflexi</i>	0.49 a	0.06 b	0.58 a	0.62 a
<i>Phylum Nitrospira</i>	0.11 a	0.07 a	0.10 a	0.17 a
<i>Phylum Verrucomicrobia</i>	4.30 a	3.87 ab	3.82 ab	3.39 b
<i>Phylum Gammatimonadetes</i>	0.34 a	0.10 b	0.16 ab	0.10 b
<i>Phylum TM7</i>	1.10 b	1.35 ab	1.70 a	1.40 ab
<i>Phylum Proteobacteria</i>	29.73 bc	28.15 c	37.52 a	29.97 b
<i>Phylum Acidobacteria</i>	5.60 a	3.95 bc	3.18 c	4.01 b
<i>Phylum Spirochaetes</i>	0.00 a	0.00 a	0.03 a	0.05 a
<i>Phylum Deinococcus-Thermus</i>	0.00 a	0.00 a	0.03 a	0.05 a
<i>Phylum Thermotogae</i>	0.00 a	0.00 a	0.06 a	0.00 ab
Sin Clasificar Bacteria	37.77 b	39.94 a	30.94 c	38.59 ab
Sin Clasificar del Total de Secuencias	6.43 a	6.19 a	4.69 b	5.08 b

8.5 Asignación funcional de los ribotipos, asociados al metabolismo edáfico del nitrógeno.

Como se describió anteriormente, con la intención de determinar la representación de géneros de microorganismos asociados a los procesos de fijación de nitrógeno, nitrificación, denitrificación y reducción desasimilativa de nitrato a amonio, se compararon los resultados del ribotipaje obtenidos en este estudio, con un set de información de géneros reportados para

dichas funciones en la literatura. Aunque, cabe mencionar que la presencia de un género particular no asegura que los microorganismos pertenecientes a este estén participando activamente en dicho proceso en los suelos muestreados. Sin embargo, esta información si podría interpretarse como una aproximación para determinar el potencial funcional intrínseco del suelo bajo estudio y su relación con otras variables relacionadas con el ciclaje del nitrógeno determinadas.

El primer proceso del ciclo que se analizó, fue la nitrificación, a través del análisis de los procesos de oxidación de amonio y oxidación de nitrito. Los resultados para el proceso de oxidación de amonio, son presentados en la Figura 10; se observa que de los cuatro géneros de bacterias reportados para esta función en la literatura, sólo se encontraron secuencias del género *Nitrosospira*, el cual presentó mayor proporción para la finca 1. Adicionalmente, se evaluó la proporción de secuencias asociadas al phylum de archeas *Crenarchaeota* al cual en los últimos años se le ha atribuido un papel importante en este proceso (Leininger *et al.*, 2006; Nicol & Schelper, 2006), y se evidenció una mayor representación de este phylum en la fincas 4 y 7, mientras que las fincas 1 y 6 presentaron las menores proporciones, así, se resalta como la distribución de este grupo no está relacionada con el manejo agrícola.

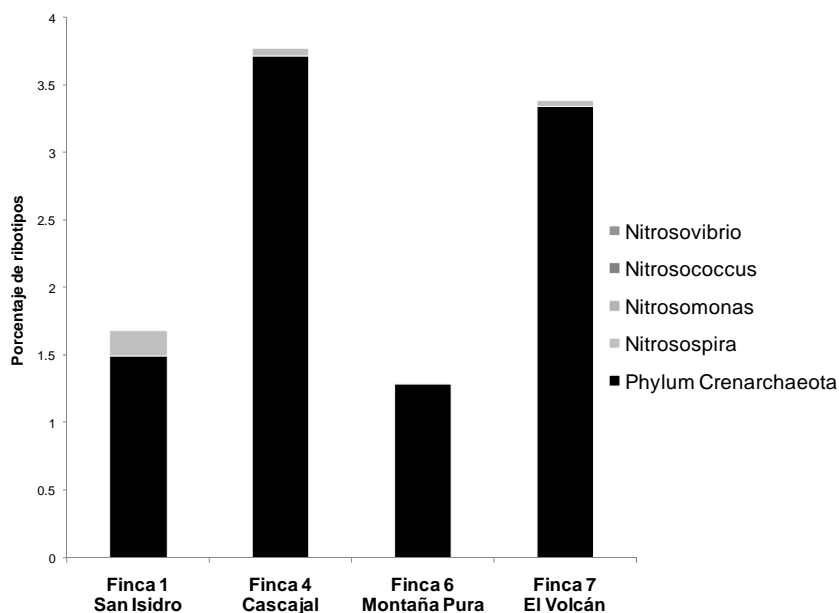


Figura 10. Proporción de ribotipos asociados al proceso de oxidación de amonio. Las barras corresponden al porcentaje de secuencias asignadas para ese género o phylum, en relación con el total de secuencias de buena calidad obtenidas para cada finca.

En relación a la oxidación de nitrito, de los cuatro géneros incluidos en el análisis, sólo dos de ellos (*Nitrobacter* y *Nitrospira*) se encontraron presentes en los suelos de estudio. Sin embargo, es importante resaltar que el género *Nitrobacter*, sólo fue reportado en las fincas con manejo orgánico (6 y 7), tal como se puede observar en la Figura 11, por tanto, la proporción relativa de ribotipos asociados a esta función es mayor en las fincas orgánicas.

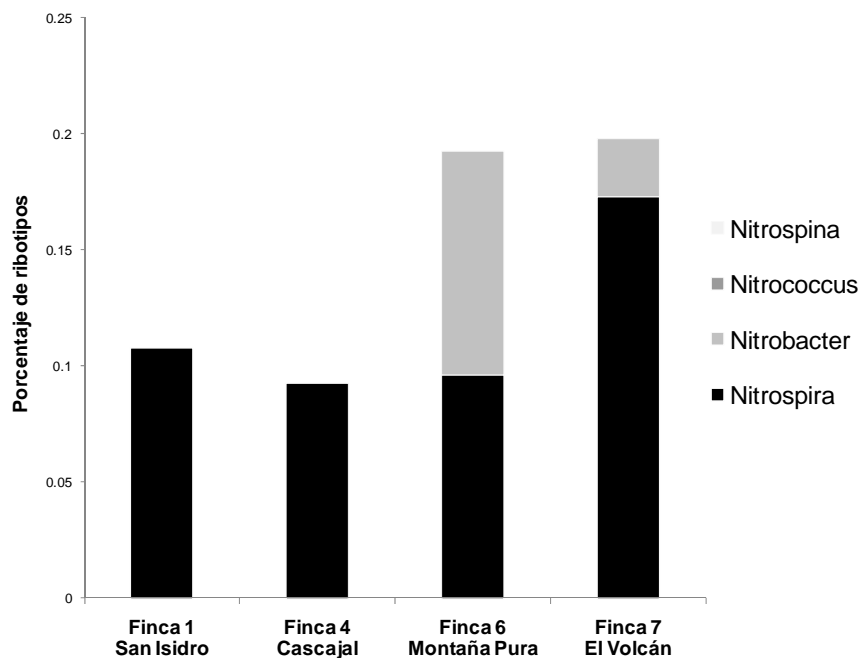


Figura 11. Proporción de ribotipos asociados al proceso de oxidación de nitrito. Las barras corresponden al porcentaje de secuencias asignadas para ese género, en relación con el total de secuencias de buena calidad obtenidas para cada finca.

Otros dos procesos del ciclo del nitrógeno, que implican la reducción de nitrato, tales como la denitrificación y reducción desasilitativa de nitrato a amonio (DNRA), también fueron considerados. Las Figuras 12 y 13, presentan los respectivos resultados. Se resalta que para los dos procesos, no hay una distribución de los resultados en relación al manejo agrícola. Por otro lado, para el proceso de denitrificación de los 25 géneros evaluados como capaces de desempeñar esta función, sólo 8 se encontraron presentes en los suelos de estudio, destacándose la finca 7, como aquella con mayor cantidad de géneros asociados (Figura 12). En cuanto a la representación porcentual de esta función en cada finca, sobresalen la finca 6 y 7 de manejo orgánico, que presentan mayor número de ribotipos asociados, comparadas con las fincas 1 y 4 de manejo tradicional.

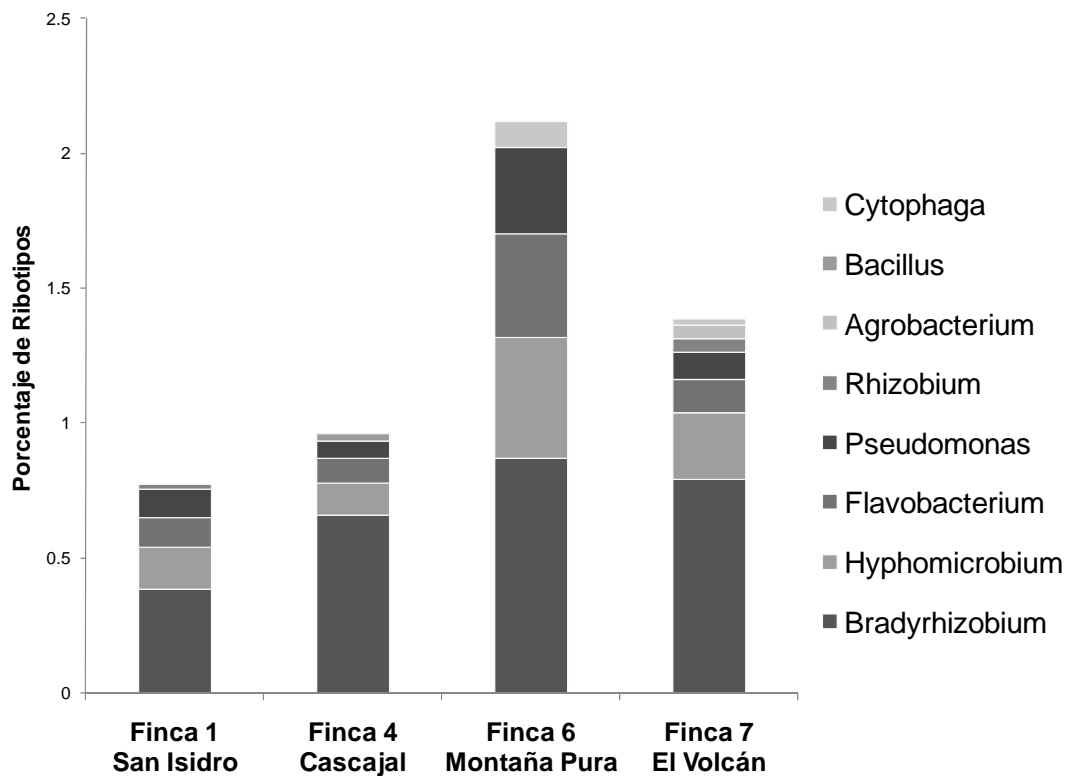


Figura 12. Proporción de ribotipos asociados al proceso de denitrificación. Las barras corresponden al porcentaje de secuencias asignadas para ese género, en relación con el total de secuencias de buena calidad obtenidas para cada finca.

En relación a los organismos que participan en la reducción desasilitativa de nitrato a amonio, de los 18 géneros determinados a partir de la revisión bibliográfica, en las fincas de estudio 5 fueron identificados, destacándose las fincas 1 y 4 como aquellas en la que se reportó la mayor cantidad de géneros (Figura 13). Sin embargo, al analizar los datos en relación con el total de secuencias obtenidas para cada finca, se destaca como la finca 6, con la mayor representación de secuencias asociadas a géneros que desempeñan esta función, seguida de la finca 1. Por su parte, las fincas 4 y 7 presentan un porcentaje similar de representación de esta función.

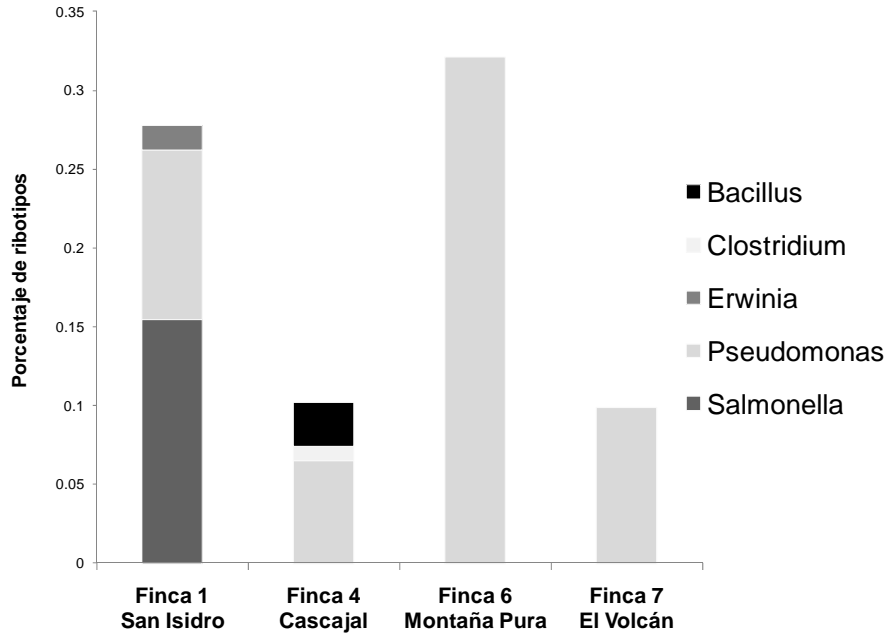


Figura 13. Proporción de ribotipos asociados al proceso de reducción desasimilativa de nitrato a amonio. Las barras corresponden al porcentaje de secuencias asignadas para ese género, en relación con el total de secuencias de buena calidad obtenidas para cada finca.

Por último, en cuanto a los fijadores biológicos de nitrógeno, se seleccionaron 118 géneros de microorganismos reportados en la literatura, de los cuales 19 se encontraron presentes en las fincas de estudio (Figura 14). Se destacan las fincas 4 y 7, que presentan el mayor número de géneros asociados (11 géneros); mientras que, la finca 6 es la que presenta el menor número con sólo 7 géneros. Además, los porcentajes acumulados de los géneros asociados a dicha función respecto al número total de secuencias son cercanos entre sí para las fincas 4, 6 y 7. Por su parte, la finca 1 presentó la menor cantidad de ribotipos asociados con esta función.

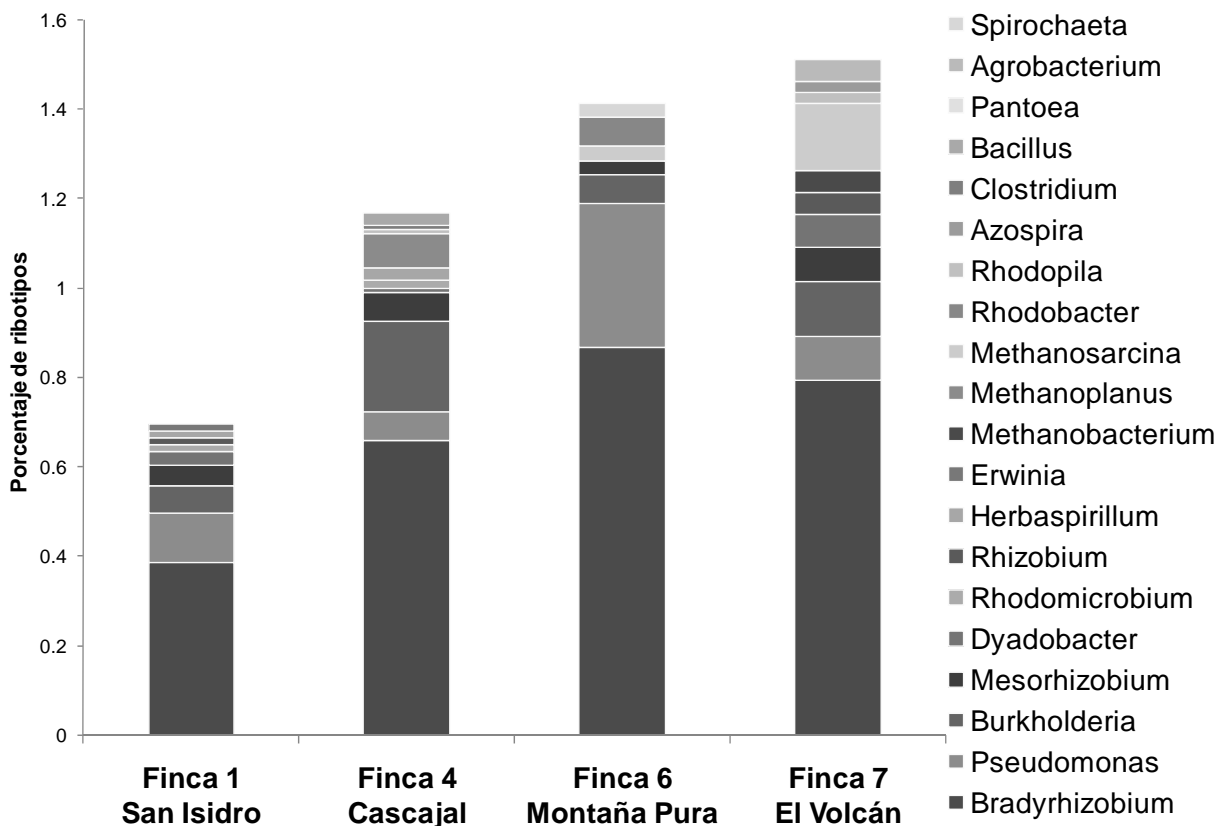


Figura 14. Proporción de ribotipos asociados al proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno. Las barras corresponden al porcentaje de secuencias asignadas para ese género, en relación con el total de secuencias de buena calidad obtenidas para cada finca.

Adicional a los análisis de secuencias del ribotipaje, a los organismos fijadores de nitrógeno aislados del recuento en placa de las cuatro fincas seleccionadas, se les amplificó (con los *primers* 27f y 1492r que amplifican todo el gen) y secuenció el gen 16s rRNA con el propósito de realizar la respectiva asignación taxonómica. Esta posteriormente fue comparada con la asignación taxonómica de géneros reportados en la literatura, que fueron identificados en los suelos de estudio. Las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas para cada aislamiento fueron ensambladas utilizando las herramientas del programa CLC DNA Workbench®. Sin embargo, algunas de las secuencias obtenidas no pudieron ser ensambladas debido a que el tamaño de ambas secuencias no presentaba la longitud adecuada para este procedimiento, por lo tanto se decidió analizar por separado la secuencias *forward* que tuvieran una longitud igual o superior a 500 nucleótidos, es decir que contuvieran la región V3 del gen 16s, así como secuencias

reverse de una longitud igual o superior a 550 nucleótidos, con el objetivo de abarcar la región V6 del mismo gen. Dichos fragmentos fueron seleccionados como parámetros para el análisis filogenético de las secuencias obtenidas ya que según diferentes autores (Chakravorty *et al.*, 2007; Nannipieri *et al.*, 2003), dichas regiones son idóneas para diferenciar los microorganismos a nivel de género y/o especie. En caso de que para una misma cepa estuvieran disponibles las secuencias *forward* y *reverse*, estas dos fueron analizadas por separado y se verificó la correspondencia de la asignación, en este contexto la Tabla 5 presenta el resultado de la asignación para las 21 cepas analizadas, reportando la asignación con la secuencia (*forward* o *reverse*) con mayor S_{ab} score.

Tabla 5. Asignación taxonómica de los organismos fijadores de nitrógeno aislados de Agar NFB. Se presenta la asignación de género según el hit con mayor S_{ab} score, en la herramienta SeqMatch del Ribosomal Database Project.

Cepa	Longitud Secuencia	Orientación Secuencia	S _{ab} score	Género	No. Acceso Gene Bank Mayor Hit
1 - FN 01	837 pb	Reverse	0.956	<i>Microbacterium sp.</i>	Y17228 (Cepa colección DSMZ, DSM 8611)
1 - FN 02	924 pb	Reverse	0.944	<i>Serratia sp.</i>	AJ306725 (Cepa colección CIP, CIP 103238T)
1 - FN 03	932 pb	Reverse	0.923	<i>Serratia sp.</i>	AJ306725 (Cepa colección CIP, CIP 103238T)
1 - FN 04	819 pb	Reverse	0.937	<i>Serratia sp.</i>	AJ306725 (Cepa colección CIP, CIP 103238T)
1 - FN 05	930 pb	Forward	0.936	<i>Cellulomonas sp.</i>	EU373531
4 - FN 02	1407 pb	Ensamblada	0.982	<i>Enterobacter sp.</i>	AM184220
4 - FN 03	871 pb	Reverse	0.605	<i>Pseudomonas sp.</i>	AY339888
4 - FN 06	1368 pb	Ensamblada	0.934	<i>Flavobacterium sp.</i>	AY599661
4 - FN 07	775 pb	Forward	0.939	<i>Leifsonia sp.</i>	DQ901014
6 - FN 01	887 pb	Forward	0.921	<i>Enterobacter sp.</i>	CP000653
6 - FN 02	861 pb	Reverse	0.927	<i>Rhizobium sp.</i>	AJ271902
6 - FN 03	919 pb	Reverse	0.859	<i>Dyadobacter sp.</i>	AJ619978 (Cepa colección HHS, HHS 11)
6 - FN 04	888 pb	Reverse	0.574	<i>Pectobacterium sp.</i>	AF373179
6 - FN 07	891 pb	Forward	0.956	<i>Enterobacter sp.</i>	DQ279307
6 - FN 08	884 pb	Reverse	0.638	<i>Pseudomonas sp.</i>	EU934229
7 - FN 03	904 pb	Forward	0.939	<i>Paenibacillus sp.</i>	AB073190 (Cepa colección JCM, JCM 9906)
7 - FN 04	862 pb	Forward	0.874	<i>Microbacterium sp.</i>	AJ853910 (Cepa colección DSMZ, DSM 12512)
7 - FN 05	1398 pb	Ensamblada	0.944	<i>Collimonas sp.</i>	AY281138
7 - FN 06	916 pb	Forward	0.967	<i>Ralstonia sp.</i>	AB212231
7 - FN 07	1396 pb	Ensamblada	1.000	<i>Microbacterium sp.</i>	EF061897
7 - FN 09	1379 pb	Ensamblada	0.997	<i>Microbacterium sp.</i>	AJ717358

Se observa, que las 21 cepas analizadas se distribuyen en 13 géneros, de los cuales *Microbacterium*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*, presentan la mayor frecuencia, con 4, 3, 4, y 2 cepas asignadas respectivamente. El resto de los aislamientos, fueron asignados de manera exclusiva en diferentes géneros. Por otro lado, con esta información generada se realizó la comparación de la distribución porcentual de los ribotipos fijadores de nitrógeno la asignados a partir de la secuenciación masiva de las regiones variables (V5 – V6) del gen 16 s rRNA y la secuenciación del gen 16s rRNA de cepas aisladas del recuento en placa en agar NFB. Las Figuras 15 a 18, presentan el resultado de dicha comparación para cada uno de los suelos de estudio.

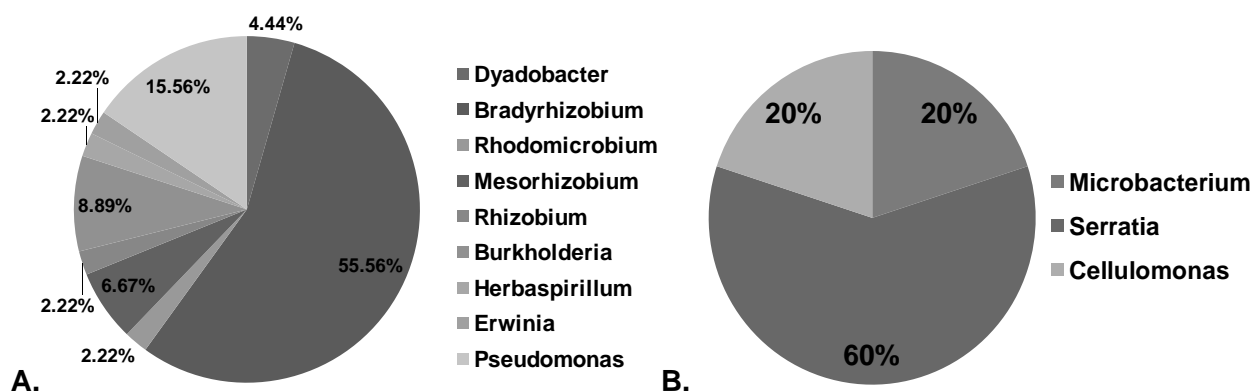


Figura 15. Géneros Fijadores de Nitrógeno Asignados Finca 1. A. Distribución de géneros reportados como fijadores en secuencias del ribotipaje para la finca 1. B. Distribución de géneros cultivables fijadores de nitrógeno aislados de la finca 1.

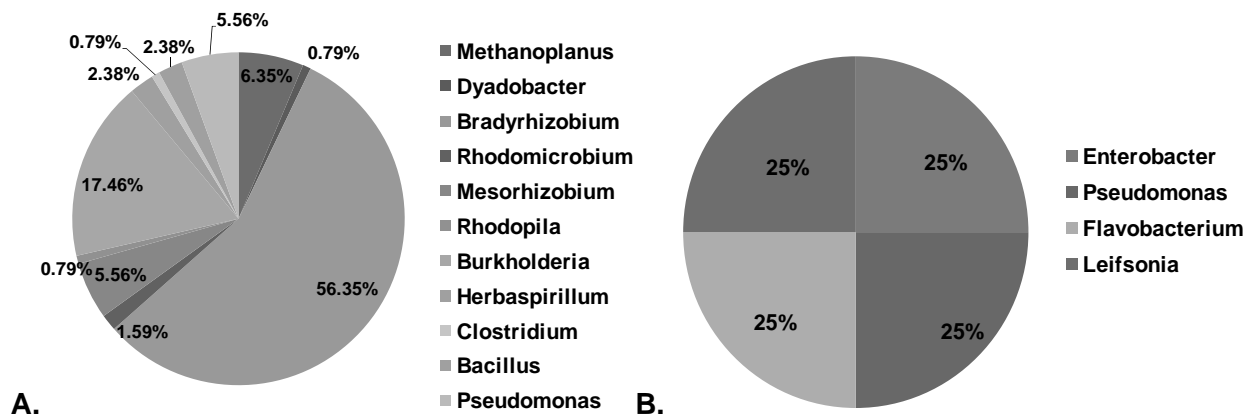


Figura 16. Géneros Fijadores de Nitrógeno Asignados Finca 4. A. Distribución de géneros reportados como fijadores en secuencias del ribotipaje para la finca 4. B. Distribución de géneros cultivables fijadores de nitrógeno aislados de la finca 4.

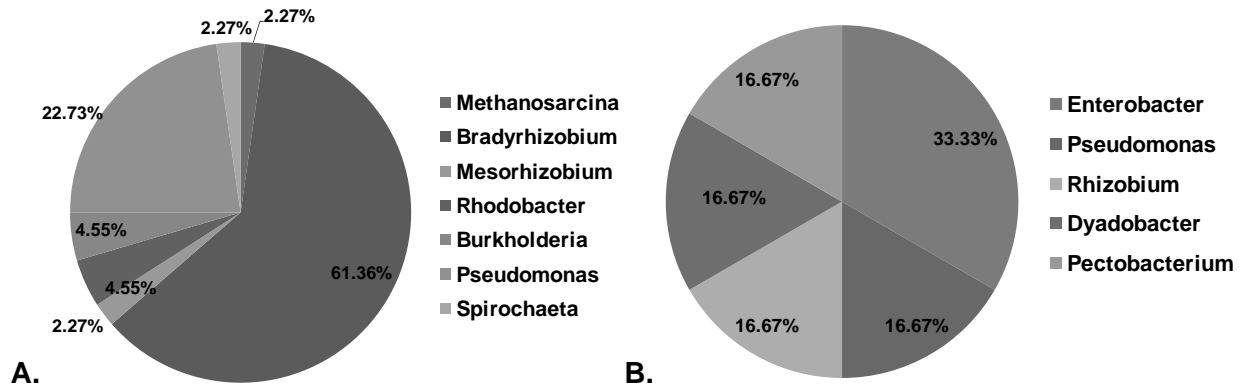


Figura 17. Géneros Fijadores de Nitrógeno Asignados Finca 6. **A.** Distribución de géneros reportados como fijadores en secuencias del ribotipaje para la finca 6. **B.** Distribución de géneros cultivables fijadores de nitrógeno aislados de la finca 6.

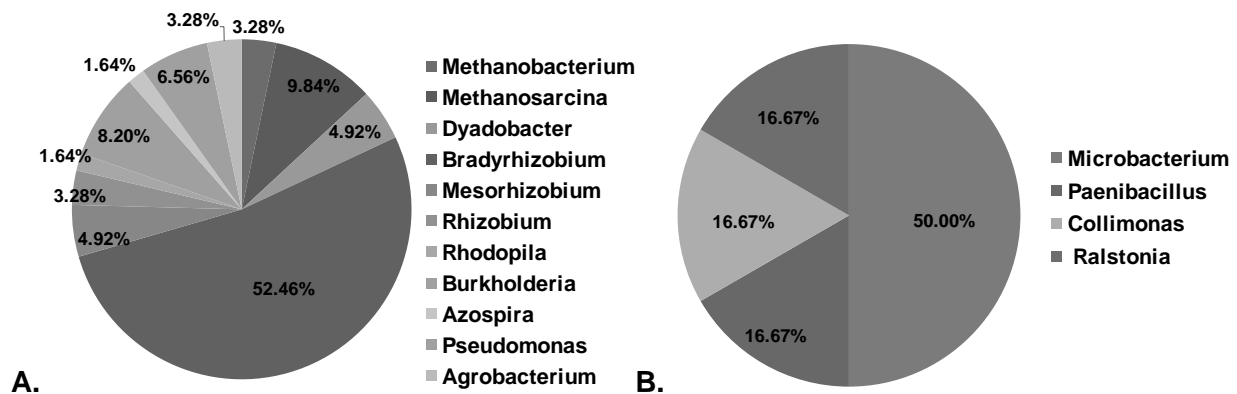


Figura 18. Géneros Fijadores de Nitrógeno Asignados Finca 6. **A.** Distribución de géneros reportados como fijadores en secuencias del ribotipaje para la finca 7. **B.** Distribución de géneros cultivables fijadores de nitrógeno aislados de la finca 7.

En primer lugar, se destaca que los géneros cultivables obtenidos como por ejemplo *Serratia* sp. y *Enterobacter* sp., no presentan una correspondencia con la información del ribotipaje realizado mediante pirosecuenciación, ya que para dicho set de datos, no se encuentran secuencias asociadas a estos dos géneros. De forma similar, llama la atención como géneros altamente representados en la asignación de ribotipos de la secuenciación masiva, como *Bradyrhizobium*, fueron identificados en los suelos paperos bajo estudio por técnicas independientes de cultivo, pero no lograron ser obtenidos a partir de los medios de cultivo específicos empleados en este estudio. Además, en general se observa poca correspondencia entre los géneros encontrados mediante las dos aproximaciones, siendo en todos los casos mayor la cantidad de géneros asociados a dicha función los recuperados mediante la

secuenciación masiva del gen 16s rRNA de las muestras de suelo, que los obtenidos a través del aislamiento de microorganismos en un medio de cultivo específico; por ejemplo, para las fincas 1 y 6, las secuencias de microorganismos cultivables asociadas a fijación de nitrógeno pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* representan un 60% y 50%, mientras que a partir de la información del ribotipaje esta familia sólo representa el 0.23% y 0.032% respectivamente, de las cuales sólo el 0.015% para la finca 1 se asocia con secuencias de géneros asociados a este proceso, mientras que para la finca 6, ninguna de estas secuencias de la familia *Enterobacteriaceae* ha sido asociada con dicha función.

Por último, se analizó la correspondencia de los porcentajes acumulados de ribotipos asociados a cada función, con otras variables evaluadas tales como los recuentos de grupos funcionales cultivables, actividad nitrogenasa y concentración de nitrógeno total, amonio y nitrato. La Tabla 6, presenta los resultados del análisis integrado de diferentes variables relacionadas con fijación biológica de nitrógeno, en dicha tabla no se observa correspondencia entre la estimación de la comunidad realizada por técnicas dependientes de cultivo (recuento) y la observada mediante una aproximación independiente de cultivo (% acumulado de ribotipos), sin embargo, esta última variable si presento una tendencia similar a la observada con la actividad nitrogenasa del suelo (función) e inversa con la concentración de amonio. En relación al número de géneros cultivables observados y los géneros asignados del ribotipaje, tampoco se observan tendencias similares.

Tabla 6. Resumen de diferentes variables asociadas al proceso de fijación biológica de nitrógeno. Se presenta: recuento en Agar NFB y actividad nitrogenasa, porcentaje acumulado de ribotipos, número de géneros obtenido mediante las dos aproximaciones y la concentración de amonio en los suelo. Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí a un P = 0.05.

Variable	Finca 1 San Isidro	Finca 4 Cascajal	Finca 6 Montaña Pura	Finca 7 El Volcán
Recuento (UFC/gr ss)	2.16 x 10 ⁸ b	2.79 x 10 ⁸ a	6.03 x 10 ⁷ d	9.74 x 10 ⁷ c
ARA (nmoles etileno 24 hrs g ⁻¹ de suelo seco)	2787.17 b	3139.35 b	14877.77 a	4286.52 b
% ribotipos asociados a la función	0.694 c	1.165 ab	1.412 b	1.509 a
No. Géneros Fijadores Cultivables	3	4	5	4
No. Géneros Fijadores del Ribotipaje	9	11	7	11
Amonio (mg Kg ⁻¹)	24.50	31.20	11.10	11.70

La relación entre la información obtenida de los otros grupos funcionales del metabolismo edáfico del nitrógeno mediante las dos aproximaciones (ribotipaje y recuento), también fue analizada, en general no se observan las mismas tendencias entre la proporción de la comunidad evaluada mediante las dos metodologías. Los anteriores resultados, son presentados a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. Relación entre la estimación de los grupos funcionales obtenidos mediante la aproximación dependiente e independiente de cultivo. Se presenta: recuento mediante número más probable para cada grupo y porcentaje acumulado de ribotipos de géneros asociados con cada proceso del ciclo. Los datos mostrados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí a un $P = 0.05$.

	Finca 1 San Isidro		Finca 4 Cascajal		Finca 6 Montaña Pura		Finca 7 El Volcán	
	NMP	% Ribotipos	NMP	% Ribotipos	NMP	% Ribotipos	NMP	% Ribotipos
Oxidadores de Amonio	1.15×10^2 a	0.185 a 1.500 b	1.02×10^4 c	0.055 b 3.720 a	6.99×10^2 ab	0.000 c 1.284 b	2.00×10^2 b	0.049 ab 3.340 a
Oxidadores de Nitrito	1.58×10^4 a	0.108 a	8.90×10^4 c	0.092 a	1.79×10^3 b	0.193 a	6.98×10^3 abc	0.198 a
Denitrificantes	$> 2.51 \times 10^6$	0.771 c	$> 2.14 \times 10^6$	0.962 c	2.44×10^2	2.118 a	1.33×10^6	1.385 b
DNRA	ND	0.278 a	ND	0.102 bc	ND	0.321 a	ND	0.099 ac

Por último, se realizó un análisis de clusters jerárquico con las diferentes variables evaluadas del metabolismo edáfico del nitrógeno (recuentos y actividades enzimáticas), así como la descripción general de la estructura de la comunidad (proporción de cada phylum por finca), sin embargo no se observó agrupación diferencial de las fincas de acuerdo al manejo agrícola (Anexo 3). No obstante, al considerar únicamente los resultados de las proporciones acumuladas de ribotipos para cada función, se observa nuevamente una separación de las fincas de acuerdo al manejo agrícola (Figura 19), tal como se observó con las variables físico – químicas, lo anterior podría sugerir, que el manejo agrícola afecta los parámetros físico – químicos, que a su vez afectan la distribución de las diferentes comunidades edáficas (analizadas por una aproximación robusta como la pirosecuenciación) asociadas al metabolismo del nitrógeno.

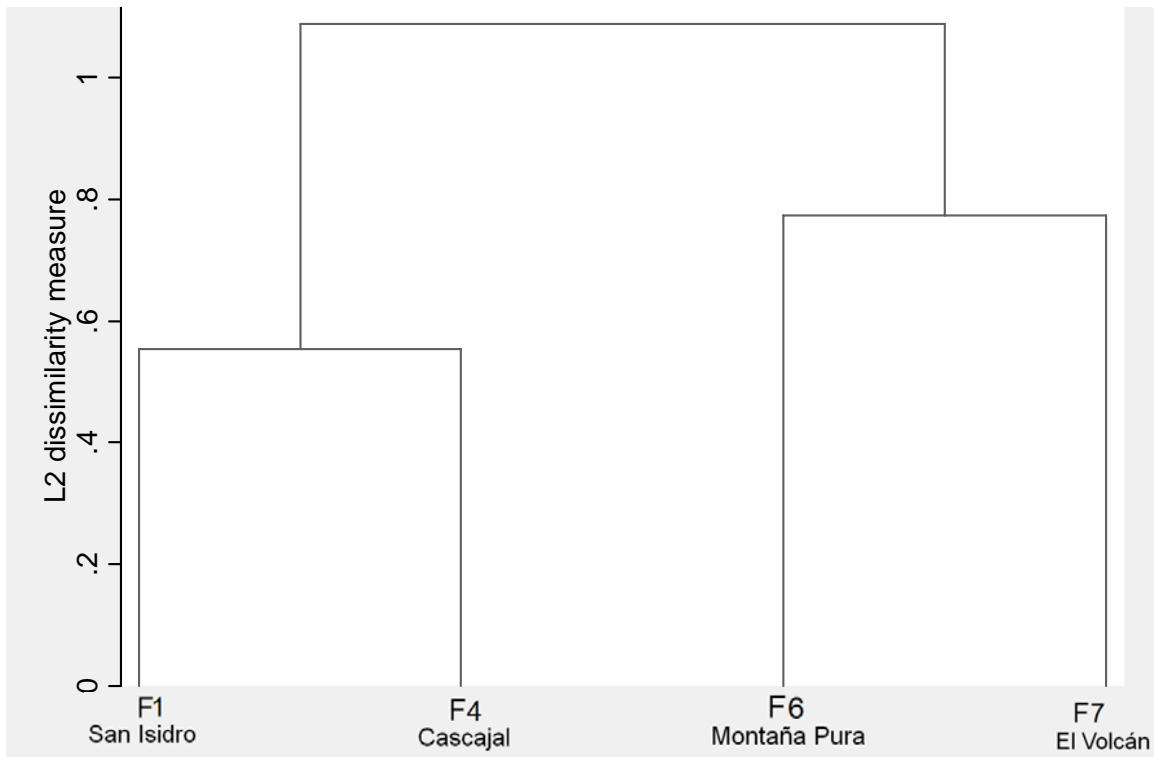


Figura 19. Análisis jerárquico de clusters para los suelos de estudio, en relación a las proporciones de ribotipos asociados a los diferentes procesos del ciclo del nitrógeno.

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo, demuestra la importancia de la integración de diferentes aproximaciones para el entendimiento del metabolismo edáfico de nutrientes, que dependen de la transformación mediada por microorganismos para su circulación a lo largo del ecosistema, como es el caso del nitrógeno, puesto que el análisis conjunto de la información recopilada puede proporcionar información importante acerca de la ecología de las poblaciones que median sus transformaciones, permitiendo a futuro proponer acciones que aumenten la eficiencia de la fertilización y mejoren la disponibilidad del mismo para la planta, conllevando a un aumento en la productividad. Además, al analizar suelos agrícolas con manejo contrastante (orgánico y tradicional), se pueden establecer algunos rasgos particulares del ciclaje de dicho elemento y de las poblaciones microbianas asociadas a su transformación, en relación con las prácticas agrícolas.

Lo primero que se debe resaltar, es que para los suelos de estudio, los parámetros físico – químicos al parecer están influenciados por las prácticas de manejo agrícola, de tal forma que permiten agrupar las fincas acorde a cada manejo (Figura 1). En este sentido, el contenido de materia orgánica de los suelos parece ser un factor determinante para establecer dicha discriminación, ya que en este análisis, las fincas con mayor contenido de materia orgánica (1, 4, 6 y 7), se agrupan en un mismo cluster, diferente al que forman las fincas con contenidos de materia orgánica menores (2, 3 y 5). Lo anterior, es una observación importante, dado que esto podría sugerir que la mineralización de materia orgánica podría ser un factor determinante para establecer las diferencias en el ciclaje de elementos presentes en esta, como es el caso del nitrógeno, en los suelos de estudio.

En la literatura se encuentran reportes contradictorios, para describir el efecto de las prácticas agrícolas en dichas variables físico – químicas del suelo. En primer lugar, Mäder *et al.*, (2002) señalan que en campos experimentales sometidos por más de 21 años a manejo tradicional u orgánico son pocas las diferencias encontradas en las propiedades físico-químicas de los suelos con los dos manejos. Sin embargo, Bulluck *et al.*, (2002), observan diferencias en

variables físico – químicas en los suelos estudiados, en relación con el tipo de enmienda aplicada (orgánica o fertilizantes sintéticos). Los dos autores coinciden con la observación de que en general los niveles de pH y las concentraciones de calcio de los suelos sometidos a manejo orgánico son mayores, lo cual es similar a lo observado en el presente estudio. Se propone, que los aumentos de pH podrían ser debidos a un incremento en la saturación de bases y la acción de agentes complejantes presentes en las enmiendas orgánicas, sobre algunos metales como el aluminio (Bulluck *et al.*, 2002). En relación con el calcio, las concentraciones superiores de este elemento, podrían ser explicadas por la naturaleza propia de la enmienda orgánica aplicada, ya que generalmente, con el propósito de estabilizar el pH de esta, sales de calcio (por ejemplo yeso) son aplicadas durante su fabricación, como es el caso del bocachi aplicado a las fincas 6 y 7.

En relación a otras propiedades físico – químicas diferenciales entre manejos, se destacan las altas concentraciones de sodio en el manejo orgánico, sin embargo, algunos autores en parcelas experimentales, evaluaron el efecto de las enmiendas orgánicas sobre la acumulación de sodio, concluyendo que no hay un efecto sobre la acumulación de este elemento y la aplicación de dichas enmiendas (Howe & Wagner, 1996), mientras que en otros estudios que comparan estos dos manejos, no se hace referencia a observaciones importantes de la concentración de dicho elemento (Mäder *et al.*, 2002; Bulluck *et al.*, 2002; Monokrousos *et al.*, 2006). Además, en la descripción de la enmienda orgánica tipo bocachi aplicada en las fincas 6 y 7 proporcionada por el agricultor (Anexo 1), no se describe la utilización de algún compuesto para su fabricación, que pueda aumentar dichas concentraciones del elemento, por lo cual las concentraciones elevadas de este, podrían ser consecuencia de la naturaleza propia de los suelos, como por ejemplo el material parental del cual son derivados. Asimismo, las concentraciones de hierro, superiores en los suelos con manejo tradicional, podrían ser consecuencia de la fertilización donde este es aplicado como un microelemento, mientras que en las fincas de manejo orgánico dicha aplicación no sucede.

Una observación adicional importante, son los bajos contenidos de amonio y nitrato de las fincas con manejo orgánico, mientras que las fincas de manejo tradicional a excepción de la Finca 1 presentan contenidos de nitrógeno total menores. Posiblemente, las diferencias en la

concentración de estas formas minerales de nitrógeno son consecuencia de que en los manejos tradicionales altos contenidos de estas formas (100 a 150 Kg ha⁻¹) son adicionados al suelo, mientras que en los manejos orgánicos, la aplicación de nitrógeno se realiza en formas orgánicas (compost, estiércol vacuno), por lo que el nitrógeno orgánico (determinado en la medición de nitrógeno total) debería ser la principal forma de nitrógeno en estos suelos, tal como se observa. Resultados similares, fueron encontrados por Briar *et al.*, (2007), quienes encontraron que los suelos tratados con sistema convencional contenían una mayor proporción de nitrógeno mineral, representada en mayores contenidos de nitrato, mientras que los suelos con sistemas orgánicos contenían mayor nitrógeno contenido en la biomasa microbiana, indicando cambios en la proporción de nitrógeno mineral/orgánico del suelo.

Al analizar poblaciones específicas relacionadas con el metabolismo edáfico del nitrógeno en medios de cultivo especiales para cada grupo, se pudo identificar como algunas variables físico – químicas están relacionadas con la abundancia de algunos grupos funcionales asociados a este ciclo en particular. Tal es el caso de los organismos fijadores de nitrógeno, los cuales muestran una relación positiva con la concentración de amonio, lo cual puede deberse a que un aumento en la concentración de este nutriente, favorece el desarrollo de dicha población, ya que el metabolismo energético puede concentrarse en el crecimiento y desarrollo celular, en lugar de llevar cabo a un proceso tan costoso como la fijación biológica de nitrógeno. Algunos autores, como Kleiner (1976), han descrito un aumento en la tasa de crecimiento de estos organismos ante la adición de amonio al medio. De otro lado, la relación negativa entre el número de estos organismos y la humedad, es contraria a lo esperado, ya que en ambientes muy húmedos, la disponibilidad de oxígeno es reducida, un factor que podría favorecer a los microorganismos que dependen de la fijación biológica para su desarrollo, ya que se ha reportado que el oxígeno puede regular la actividad nitrogenasa, así como la estabilidad de la enzima (Hartmann & Burris, 1987; Smith *et al.*, 1987).

En este mismo sentido, se destacan las relaciones encontradas con este grupo y variables relacionadas con la estructura del suelo (negativa con arena y positiva arcillas y limo); así por ejemplo, las arcillas podrían influir en la abundancia de los microorganismos, ya que son capaces de albergar a las bacterias adheridas a su superficie, proporcionando una barrera

física de protección y una movilidad restringida, que garantiza una mayor permanencia de estas en el suelo (Marshall, 1975). Asimismo, según Tripathi *et al.* (2002), el sodio también puede ser un factor determinante en el desarrollo de algunos microorganismos fijadores de nitrógeno, ya que se ha evidenciado que puede ser el responsable de una disminución en la síntesis y actividad de la nitrogenasa. Por último, la relación positiva con el hierro podría ser debida a la importancia de este ión en la estructura de la nitrogenasa (Ferguson, 1998).

Es importante considerar que se observó una relación inversa entre los dos procesos biológicos que implican entradas de nitrógeno (mineralización de materia orgánica y fijación de nitrógeno atmosférico) representadas en la abundancia de bacterias amonificantes y la actividad nitrogenasa lo cual sugiere que el ingreso de amonio al sistema por alguna de las dos vías, disminuye la actividad de la otra, o bien, que existe una competencia entre estos dos grupos funcionales por el amonio y este elemento se constituye en un factor determinante para el desarrollo de una de las dos poblaciones en consecuencia del detrimento de la otra. La actividad nitrogenasa, además, mostró relación con el magnesio, el cual se sabe puede ser un cofactor de muchas enzimas que interviene en el transporte de ATP en la célula, lo cual a su vez es particularmente importante para la fijación biológica de nitrógeno dados los altos requerimientos energéticos de este proceso (Sylvia *et al.*, 2005). Asimismo, el manganeso ha sido identificado como un elemento traza importante para la fijación biológica de nitrógeno en algunos microorganismos, al punto que Yoch (1979), lo propone como un regulador de la actividad nitrogenasa.

Es importante resaltar, que aunque el grupo de organismos fijadores muestran relaciones con variables físico – químicas del suelo; no se encontró relación con variables agronómicas como la fertilización (Kg ha^{-1} de nitrógeno, potasio o fósforo agregados) y producción. Sin embargo, los microorganismos proteolíticos mostraron una relación positiva con esta última variable, lo cual es importante si consideramos que todas estas aproximaciones al conocimiento de la dinámica de los nutrientes en los sistemas agrícolas esta orientada a mejorar la productividad de los mismos.

En relación con los microorganismos proteolíticos, se puede comentar además que su abundancia esta relacionada con variables involucradas en el proceso de mineralización de la materia orgánica, tales como la humedad (0.8255), la capacidad de intercambio catiónico (0.9394), el carbón orgánico (0.7491), así, como con el contenido de nitrógeno total (0.8992). Lo anterior, sugiere que este mecanismo de entrada y transformación de nitrógeno juega un papel muy importante en el sistema de producción, a pesar de los altos niveles de fertilización inorgánica a la que esta sometido este cultivo (entre 700 y 900 kg ha⁻¹, aproximadamente 100 a 150 kg ha⁻¹ de nitrógeno mineral aplicado) en las zonas de estudio. En este sentido merece mencionar lo sugerido por de Gastal & Lemaire (2002), quienes aseguran que aunque la adquisición de nitrógeno por las plantas es generalmente en formas inorgánicas como amonio y nitrato, el nitrógeno orgánico del suelo puede ser utilizado, representando incluso una porción significativa del nitrógeno total absorbido, especialmente, bajo condiciones ecológicas particulares como las presentes en suelos ácidos y ambientes de baja temperatura, características propias de los suelos del presente estudio.

Asimismo, Jackson *et al.* (2008) afirman que el ciclo del nitrógeno en el suelo es conducido por la materia orgánica del suelo, que contiene aproximadamente un 5% de nitrógeno; resaltan además, que el concepto clave es que los ciclos del carbono y nitrógeno, están estrechamente relacionados, dado que la disponibilidad de carbono, puede direccionar los procesos microbianos que transforman el nitrógeno a formas disponibles para las plantas. Por tanto, aceptar el concepto de que la mineralización de nitrógeno es un proceso que dirige el ciclo de este elemento en el suelo, implica que la despolimerización conducida por enzimas debería ser el paso limitante en la generación de nitrógeno biodisponible, lo cual sugiere que una de las maneras más apropiadas para la determinación de la despolimerización de este nitrógeno orgánico, sería la determinación de la actividad proteasa (Schimel & Bennet, 2004).

Sin embargo, a pesar de lo mencionado arriba, la actividad proteasa global de los suelos de estudio, no mostró correlaciones de esta variable, con otras relacionadas con la mineralización de la materia orgánica. Aunque merece mencionar, que si se observa cierta tendencia a que fincas con mayores cantidades de carbón orgánico y nitrógeno total, presenten las mayores actividades enzimáticas (caso de las Fincas 1 y 6) lo cual coincide con lo sugerido por otros autores (Fuka *et al.* 2008, Kunito *et al.* 2001 y Saha *et al.*, 2008). Sin embargo, la

finca 5, que presenta los menores niveles de carbón orgánico y nitrógeno total también presenta actividades enzimáticas altas, y comparables a las de las fincas mencionadas anteriormente, lo anterior, hace pensar que hay otros factores relacionados que pueden afectar la actividad proteasa del suelo. Por ejemplo Schloter *et al.*, (2003), sugieren que las proteasas pueden ser estabilizadas en las partículas de arcilla del suelo, por lo que la determinación de la actividad enzimática por sí sola no es un indicador sensible de la actividad proteolítica de los microorganismos en un momento puntual.

En este sentido, se resalta que esta finca (finca 5), es la que contiene los porcentajes más altos de arcilla y esto, según Fuka *et al.* (2008), podría influir ya que en suelos arcillosos hay una estabilización de las proteasas sobre las partículas de arcilla, mientras que, en los suelos arenosos la actividad enzimática, dependería de la actividad de las enzimas liberadas por los microorganismos del suelo. Merece mencionar que al excluir la finca 5 de los análisis de correlación, se observan correlaciones positivas significativas de la actividad proteasa con producción, carbón orgánico, capacidad de intercambio catiónico, humedad y nitrógeno total. Lo anterior indica nuevamente una relación entre la actividad proteolítica y mineralización del nitrógeno, actividad que aparentemente juega un papel muy importante en el ciclaje de nitrógeno en cultivos de *S. phureja* interfiriendo directamente con su productividad. La afirmación anterior esta en contraposición con lo sugerido por Castro (2005), quien propone que dado el bajo índice de mineralización de materia orgánica debido a las bajas temperaturas y a la inactivación de las bacterias nitrificantes por efecto del alófono, la materia orgánica no es un índice de la disponibilidad de nitrógeno para la planta en los cultivos de papa.

Por otro lado, merece mencionar una relación positiva de la proteasa con los niveles de cobre medidos en el suelo. Hallazgos similares, fueron obtenidos por Kunito *et al.* 2001, indicando que dichos resultados pueden ser debidos a un fenómeno de multicolinealidad entre el cobre determinado, el carbón orgánico del suelo y el pH. En nuestro caso, el fenómeno podría ser similar ya que la concentración de cobre, está igualmente relacionada con la humedad, el carbón orgánico y el nitrógeno total, las cuales son variables que se espera favorezcan esta actividad enzimática. Además, aunque se reconoce que la principal fuente de peptidasas del

suelo son las metaloproteasas Bach & Munch. (2000), en nuestro conocimiento, aún no se describe al cobre como un cofactor que potencie esta actividad.

Otro hallazgo interesante, es que aunque existe relación positiva entre el número más probable de microorganismos proteolíticos y la actividad proteasa, esta no es significativa. Dicha observación, se repite para los organismos fijadores de nitrógeno, quienes no mostraron un vínculo fuerte entre abundancia y función (actividad nitrogenasa); sugiriendo entonces, la alta elasticidad y redundancia de las comunidades microbianas, que garantiza el desarrollo de la función, independientemente del número. Sin embargo, Sakurai *et al.* (2007), encontraron relaciones significativas entre la actividad proteolítica y la estructura de la comunidad determinada por la técnica de DGGE, lo cual les permite sugerir que las comunidades bacterianas proteolíticas pueden jugar un papel fundamental en la actividad proteasa global del suelo. Por tanto, sería importante considerar el seguimiento de marcadores específicos de este grupo con el objeto de conocer un poco la estructura de la comunidad que realiza dicha función, permitiendo establecer los cambios de esta, en relación con el manejo agrícola y las condiciones propias del suelo, aún cuando la función permanezca intacta.

En una segunda aproximación, el presente estudio se centró en describir las comunidades edáficas asociadas a 4 de los suelos de estudio, seleccionados por su agrupación en un mismo cluster en función de las propiedades físico – químicas y su manejo agrícola contrastante, a través de una aproximación independiente de cultivo. Al analizar la descripción general de la población obtenida mediante la secuenciación masiva, es importante resaltar que junto con observaciones previas para el mismo “set” de datos (García *et al.*, 2009), se observa que los suelos con manejo agrícola tradicional presentan mayores índices de riqueza a nivel de especie, mientras que las fincas con manejo orgánico presentan una mayor cantidad de *phylum*; estos resultados podrían coincidir con lo observado por Roesch *et al.* (2007), quienes al analizar las secuencias de la región variable del gen 16s rRNA V9, obtenidas a través de una estrategia de pirosecuenciación, observan que los suelos agrícolas son más ricos a nivel de especie, pero menos ricos a nivel de *phylum* en comparación con suelos de bosque.

Por otro lado, Acosta – Martínez *et al.* (2008), al estudiar las comunidades edáficas en suelos contrastantes (agrícolas y pastizales no perturbados), mediante una estrategia de pirosecuenciación de una región variable del gen 16s rRNA, observan que los suelos agrícolas, presentaban la mayor (suelos con rotación) y menor diversidad (monocultivo de algodón), en relación con los pastizales no perturbados. Lo cual sugiere que además de la aplicación o no de fertilizantes químicos, existen otros factores que determinan la diversidad de los microorganismos en los suelos agrícolas, como en este caso la rotación. Estos autores, proponen que los mayores índices de diversidad en los suelos agrícola con rotación, pueden ser consecuencia de que en los suelos con rotación, las son poblaciones más dinámicas, ya que por ejemplo, hay diferentes tipos de sustratos para el desarrollo de los microorganismos (exudados radicales, fertilizantes, compuestos xenobióticos) respecto a las que podrían encontrarse en los suelos no perturbados, que se encuentran permanente estable. En un sentido similar, algunos autores (Mäder *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 2006; Monokrousos *et al.*, 2006) al analizar las poblaciones microbianas, utilizando como indicadores la biomasa total de carbono y nitrógeno, perfiles de ácidos grasos, o al determinar la actividad microbiana mediante actividades enzimáticas o tasas de respiración, encontraron que el manejo agrícola (aplicación de enmiendas orgánicas o minerales) diferenciaba las poblaciones de microorganismos, indicando que en general se observa una mayor diversidad en los sistemas con manejo orgánico.

Según lo anterior, vemos como existen reportes previos de que las prácticas agrícolas afectan a las comunidades edáficas, y que en algunos casos, el impacto es incluso determinado por otros factores, como la rotación, más allá de la aplicación de fertilizantes minerales. En los suelos del presente estudio, como se describió anteriormente, se observó una mayor diversidad de microorganismos a niveles taxonómicos inferiores en los suelos de cultivos con manejo tradicional posiblemente porque en estos, las poblaciones son más dinámicas, gracias a una mayor disponibilidad y diversidad de sustratos que pueden ser asimilados directamente (como los fertilizantes); mientras que en los suelos con manejo orgánico, dado que las enmiendas son compuestos que requieren de pasos de degradación antes de ser asimilables, es probable que haya una “selección” de microorganismos en función de su capacidad de utilizar las fuentes de nutrientes aportadas en dicha enmienda, es decir que ocurra cierto nivel de especialización que le dé estabilidad a la comunidad, razón por la cual el número de especies es menor. Sin

embargo, a un nivel taxonómico mayor, como el nivel de phylum, se observa un comportamiento contrario, demostrando que algunos phylum de microorganismos se encuentran presentes en suelos de manejo orgánico, pero no de manejo tradicional, indicando que podría haber una presión de selección adicional de estas comunidades edáficas, por factores relacionadas al manejo, como por ejemplo la toxicidad de algunos compuestos xenobióticos aplicados en el manejo tradicional, que después de varios años (más de 10, en los que según el agricultor de las fincas orgánicas no hay aplicación de compuestos xenobióticos), pueden inducir cambios importantes en la comunidad.

En relación con las proporciones de phylum, observadas en los diferentes suelos de estudio, es importante resaltar que al igual que Ulrich *et al.* (2008), 19 de los 24 géneros de bacterias reportados se encontraron presentes en los cuatro suelos de estudio analizados. Se resalta como los *phylum* más abundantes observados en el presente trabajo (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia*), habían sido reportados previamente por otros autores como predominantes en suelos agrícolas y no agrícolas (Roesch *et al.*, 2007; Acosta – Martínez *et al.*, 2008; Ulrich *et al.* 2008; Janssen *et al.*, 2006; Hansel *et al.*, 2008), sin embargo, las proporciones de representación reportadas para cada grupo son diferentes en cada estudio, y a las observadas en los suelos de este trabajo. Por ejemplo, según Janssen *et al.* (2006), en una revisión de los *phylum* más reportados en diferentes estudios de las comunidades de microorganismos en el suelo, indica que la representación del *phylum Acidobacteria* en el suelo es de aproximadamente el 20%, igualmente Lee *et al.* (2008), señalan que los microorganismos de este *phylum* son dominantes y metabólicamente activos en suelo rizosférico de árboles de castaño (65% de las secuencias analizadas); sin embargo, en los suelos analizados de rizósfera de papa criolla, dicha familia de microorganismos no representa más de un 6% de la proporción de secuencias, esto puede ser debido a de que los suelos de estudio presentan un alto contenido de materia orgánica, condición que al parecer limita el desarrollo de este grupo, ya que estos son microorganismos oligotrofos que al parecer presentan relaciones negativas con el contenido de carbono del suelo (Lee *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009).

El phylum *Proteobacteria*, que fue encontrado como el más abundante en los suelos de estudio, generalmente ha sido reportado como el más frecuente en el suelo (Filion *et al.*, 2004; Janssen *et al.*, 2006), lo cual corresponde con la observación de que este grupo de organismos es tanto genéticamente diverso como metabólicamente versátil (Lee *et al.*, 2008), lo cual le permitiría estar altamente competitivo ante un disturbio en el ambiente. Esta observación se complementa, con el hecho de que no se encontraron diferencias en la proporción de este phylum y la gran mayoría de phylum encontrados en los suelos de estudio, lo cual, podría ser explicado por el hecho de que las comunidades microbianas del suelo presentan una gran estabilidad y resiliencia (Torsvik & Øvreas, 2002), de manera tal que a pesar de que hay diferencias en las prácticas agrícolas lo cual podría generar disturbios, las poblaciones tienden a ser estables.

De otro lado, el phylum *Bacteroidetes*, del que se habían descrito altas proporciones en los suelos de manejo agrícola, caracterizados por la aplicación de insumos químicos (Acosta – Martínez *et al.*, 2008; Roesch *et al.* 2007), en relación con suelos no perturbados (bosques o reservas forestales) fue encontrado en los suelos del presente estudio en proporciones mayores, aunque no significativamente diferentes en los suelos de manejo orgánico, contradiciendo un poco la afiliación establecida entre este grupo y suelos con historia de aplicación de fertilizantes. Lo anterior, sugiere que en los suelos bajo estudio existen otras condiciones diferentes al manejo agrícola, que afectan la distribución de este grupo de microorganismos en el suelo. Por su parte, el phylum *Planctomycetes* fue el único que presentó diferencias significativas en las proporciones encontradas entre fincas de manejo tradicional y manejo orgánico, siendo representados en mayor proporción para estas últimas. Este grupo, sería importante estudiarlo más detalladamente, ya que se ha propuesto que microorganismos de esta phylum desempeñan un papel muy importante en el ciclo del nitrógeno, a través de la oxidación anaerobia de amonio, conocida como anammox (Wagner & Horn, 2006; Elshahed *et al.*, 2007), un proceso del que hay relativamente poco conocimiento.

En relación con la abundancia de grupos asociados al metabolismo del nitrógeno, se puede observar, que para los organismos oxidadores de amonio sólo se encuentra representación de uno de los géneros de bacterias buscados (*Nitrosospira sp.*), lo cual concuerda con lo descrito

por algunos autores (Belser, 1979; Bothe *et al.*, 2000) que resaltan el género *Nitrosospira sp.* como el microorganismo oxidador de amonio con mayor distribución en muestras de suelo. Por otro lado, el phylum de archeas *Crenarchaeota*, que ha sido propuesto como determinante en el proceso de oxidación de amonio en el suelo dada su alta proporción y distribución (Leininger *et al.*, 2006; Nicol & Schelper, 2006), también se encuentra en altas proporciones en los suelos de estudio; incluso para algunas fincas (4 y 7) la proporción de ribotipos de este phylum de archeas, respecto a la proporción acumulada de bacterias oxidadoras de amonio es aproximadamente 60 veces mayor, lo que podría indicar que microorganismos miembros de este phylum podrían ser fundamentales para este proceso en los suelos de estudio. Esta observación, corresponde con la de otros autores, que describen una proporción de ribotipos de estas archeas 10 veces mayor que la proporción de bacterias oxidadoras de amonio (Urich *et al.*, 2008).

Además, los hallazgos de Roesch *et al.* (2007), son similares a los del presente estudio, en el sentido que el género *Nitrosospira sp.* presenta las mayores proporciones de secuencias para esta función, y que en el suelo donde menor proporción de archeas oxidadoras de amonio encontraron, también se reportó disminución de la población de bacterias oxidadoras de amonio, es decir que una población no reemplaza a la otra, como se observó en la finca 6, la cual presenta las menores proporciones tanto de archeas como de bacterias oxidadoras de amonio, sugiriendo que en dicho suelo existe un factor que puede estar inhibiendo el proceso de nitrificación, o la estabilidad de las poblaciones que lo llevan a cabo.

Al comparar la estimación de estos organismos oxidadores de amonio, obtenida mediante el recuento por número más probable y la asignación de ribotipos a la función, vemos que no hay una tendencia similar (las fincas con mayores recuentos no son las que presentan mayor porcentaje de ribotipos asociados). Una posible explicación a esta observación, puede ser sustentada en observaciones de Belser & Schmid (1978), quienes al probar tres medios diferentes para el recuento de bacterias oxidadoras de amonio, obtuvieron recuentos totales muy similares en los tres medios, pero evidenciaron cambios en la representación de individuos de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*. De tal forma que la población de estos géneros de microorganismos puede ser diferente, según la selección del medio del cultivo, lo que dificulta

aún más el establecer relaciones con la aproximación independiente de cultivo, en la que la proporción de cada género si es un factor importante y determinante para estimar la representación de las poblaciones asociadas a dicha función.

En relación con el proceso de oxidación de nitrito, cuando se analizaron los ribotipos asociados a este proceso, genera especial interés que para las fincas de manejo orgánico, no sólo se encontraron mayores porcentajes de ribotipos acumulados de microorganismos oxidadores de nitrito, sino que también en dichos suelos, a diferencia de los suelos de manejo tradicional, se observó la presencia del género *Nitrobacter*. Lo anterior, podría sugerir, que el manejo agrícola determina cambios que permiten el establecimiento de los microorganismos de este género, sin embargo, en la revisión bibliográfica realizada, no se encontraron evidencias de cuáles podrían ser dichos factores, por lo cual podría ser importante profundizar en estudios posteriores en este punto. La alta representación de organismos asociados con este proceso, en fincas de manejo orgánico, también fue observada por Laanbroek y Gerards (1991), quienes explican que en los suelos con aporte de enmiendas orgánicas, se aumentan las tasas de nitrificación presumiblemente como consecuencia de un incremento en la mineralización de amonio el cual no es inmediatamente consumido por el cultivo o la microflora heterótrofa, permitiendo que organismos que crecen más lentamente, como los organismos nitrificantes quimiolitotótrofos, que podrían ser competidores menos eficientes por estas fuentes de nitrógeno puedan utilizarlo, presentando mayores proporciones respecto a las fincas donde el nitrógeno del fertilizante es rápidamente asimilado por competidores más eficientes.

Sin embargo, para los suelos de estudio las concentraciones de amonio, en las fincas con manejo tradicional son superiores a las de las fincas de manejo orgánico, así que la disponibilidad de amonio para los microorganismos nitrificantes debería ser superior en las fincas de manejo tradicional, contradiciendo el planteamiento descrito en el párrafo anterior. En este mismo sentido, Belser (1979), describe que las poblaciones oxidadoras de nitrito, pueden verse inhibidas por altas concentraciones de amonio, lo cual junto con la observación de que las poblaciones de microorganismos nitrificantes suelen ser mayores a pH altos (Sylvia *et al.*, 2005), podría explicar porque las fincas con manejo orgánico (con menores concentraciones de

amonio y mayor pH en relación con las fincas de manejo tradicional) tienen mayores proporciones de ribotipos de organismos oxidadores de nitrito.

Los ribotipos asociados al proceso de denitrificación, presentan un patrón similar entre las fincas con el mismo tipo de manejo agrícola, superiores para las fincas de manejo orgánico y menores para las fincas de manejo tradicional. En un estudio de la dinámica del nitrógeno en suelos fertilizados con enmiendas orgánicas, Kramer y colaboradores (2006), observan resultados comparables a los evidenciados en esta fase del estudio, en relación con que en los suelos con este tipo de manejo se presentan menores contenidos de nitrato, mayor actividad de microorganismos nitrificantes, mayor actividad de microorganismos denitrificantes. Estos autores además discuten que dichos hallazgos pueden ser importantes, porque al aumentar la actividad denitrificante del suelo, hay un consumo de nitrato, disminuyendo la cantidad de este compuesto que es lixiviado, disminuyendo el efecto ambiental negativo que tiene este fenómeno. Sin embargo, no discuten si la actividad de dichos microorganismos lleva a un proceso de denitrificación completo, o si al aumentarse la actividad de estos también aumentan las especies de nitrógeno gaseosas intermediarias en este proceso, que como se describió también acarrear problemas ambientales.

Cuando se compara los resultados de la estimación de esta población denitrificante, obtenida por las dos aproximaciones, de manera similar como se ha observado con otros grupos no hay una tendencia similar, es más para este grupo es contradictoria, ya que según el número más probable las fincas de manejo tradicional presentan la mayor abundancia de organismos denitrificantes, pero la proporción de organismos potencialmente involucrados con esta función obtenidos en el ribotipaje es mayor para las fincas de manejo orgánico, observación que como se describió anteriormente, presenta correspondencia con lo reportado por otros autores. Sin embargo, también existen estudios como el conducido por Mulvaney *et al.*, (1997), quienes en ensayos de laboratorio demuestran que los fertilizantes nitrogenados promueven la denitrificación.

Según lo anterior, es difícil establecer cuál de las dos aproximaciones está brindando una visión más cercana de la situación real del proceso de denitrificación en el suelo, dado que existen evidencias experimentales anteriores que sustentan ambos resultados. Por tanto, sería importante estudiar más detalladamente estas poblaciones ya sea mediante genes funcionales marcadores, potenciales de denitrificación o ensayos de microcosmos, en los suelos rizosféricos de papa criolla analizados; con el propósito de esclarecer cual es el efecto de las prácticas agrícolas y las propiedades del suelo sobre dichas comunidades, dado que un desbalance en esta parte del ciclo acarrea disminución de la eficiencia de la fertilización nitrogenada y problemas ambientales, discutidos previamente.

El proceso de desasimilación reductiva de nitrato a amonio que llevan a cabo algunos organismos, al ser analizado en términos de la representación de poblaciones relacionadas en las secuencias del ribotipaje, no presenta un patrón particular de agrupación en función del manejo agrícola. No obstante, se observa que las fincas con mayor representación de secuencias para esta función son las fincas con los mayores contenidos de materia orgánica (fincas 1 y 6), lo cual corresponde por lo reportado por otros autores (Sylvia *et al.*, 2005), quienes resaltan que este grupo de microorganismos que reducen el nitrato predominan en ambientes ricos en carbón, donde el metabolismo energético posiblemente este más aumentado, y haya una mayor necesidad de regenerar equivalentes reducidos a través de la reoxidación de NADH, proceso que es característico para este grupo de microorganismos en el suelo.

La población de fijadores biológicos de nitrógeno estimada por aproximaciones independientes de cultivo, a diferencia de las estimaciones relacionada por el recuento en placa, presentó una tendencia similar a la actividad enzimática del suelo, indicando que posiblemente el establecimiento de la relación diversidad – función, podría ser más fácil a través del estudio de las comunidades por técnicas independientes de cultivo robustas como la pirosecuenciación. Además, al analizar la asignación taxonómica de los microorganismos aislados en el medio de cultivo, respecto a las secuencias del ribotipaje obtenidas en los suelos de estudio, no se observa correspondencia. Lo anterior, pone en evidencia una de las principales limitaciones de las técnicas de cultivo al incorporar sesgos en el medio de cultivo, donde por ejemplo factores

como las altas concentraciones de fuentes de carbono, generan que organismos poco representados en el ambiente (por ejemplo, enterobacterias), pero de crecimiento rápido en condiciones de laboratorio se desarrollen preferencialmente, proporcionando una visión distorsionada de su distribución en el ambiente (Handelsman *et al.*,2008). Sin embargo, las evidencias presentadas en este estudio, muestran que ambas técnicas en complementan, si el propósito es realizar una descripción completa de la diversidad funcional del ecosistema, ya que los géneros de microorganismos que no son descritos en el ribotipaje, si logran ser detectados a partir de la secuenciación del gen 16s rRNA de los microorganismos cultivables.

Por otra parte, Soares *et al.* (2006), al analizar las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno asociados a la rizósfera de avena por aproximaciones tanto dependientes, como independientes de cultivo (moleculares), observan resultados similares, destacando que aunque las aproximaciones moleculares podrían generar una visión robusta de dichas comunidades, las aproximaciones cultivables presentan la ventaja adicional de que permiten el aislamiento de los microorganismos, lo cual permite realizar estudios sobre su fisiología y potencial biotecnológico.

Al realizar el análisis global de agrupamiento de las variables asociadas al metabolismo del nitrógeno, así como la distribución de la proporción de phylums en los suelos de estudio y la proporción acumulada de ribotipos que potencialmente participan en diferentes puntos del metabolismo edáfico del nitrógeno, se observo que estas últimas (porcentaje acumulado de ribotipos), son las únicas variables que permitieron una agrupación similar a la observada con las propiedades físico – químicas. Lo anterior, podría sugerir que el manejo agrícola afecta algunos factores físico – químicos de los suelos, los cuales a su vez determinan los microambientes del suelo donde se desarrollan los microorganismos, afectando su actividad, en nuestro caso particular, la participación en diferentes procesos del nitrógeno. Por lo tanto, la abundancia o proporción de estos grupos funcionales de microorganismos, analizados por una aproximación robusta como la pirosecuenciación, que incluye el análisis de una mayor cantidad de individuos que las técnicas tradicionales, ya que elimina sesgos como la selección del medio de cultivo, presenta una agrupación similar a lo observado con las variables físico –químicas.

Además, es importante resaltar que los resultados discutidos de este estudio, demuestran que el análisis integral de las comunidades funcionales de microorganismos edáficos, es útil para determinar puntos clave del ciclaje de nutrientes, en nuestro caso el nitrógeno, siendo indicadores del estatus nutricional de los suelos y abriendo las posibilidades para el estudio a profundidad de procesos susceptibles a intervención, a través de prácticas agrícolas.

10. CONCLUSIONES

El análisis holístico de los grupos funcionales que participan en la biotransformación del nitrógeno y su relación con otros parámetros bioquímicos y físico – químicos, permite identificar procesos importantes del ciclo, en función de las características propias del ecosistema; resaltando su posible utilización, como indicadores del estatus nutricional del suelo.

La mineralización de nitrógeno orgánica mediada por microorganismos proteolíticos, parece ser un proceso fundamental en los suelos de estudio donde es cultivada la papa criolla, que tiene incidencia en la productividad del cultivo, posiblemente porque aumenta la disponibilidad de fuentes nitrogenadas asimilables (monómeros y amonio) para la planta.

En los recuentos de número más probable, las poblaciones de microorganismos relacionadas con procesos de mineralización (proteolíticos y amonificantes) presentan abundancias superiores, respecto a los microorganismos nitrificantes y denitrificantes, posiblemente porque en los suelos hay una alta disponibilidad de materia orgánica que favorece el desarrollo de estos microorganismos, que obtienen su energía a partir de la utilización de estos compuestos orgánicos, mientras que los otros la obtienen de compuestos minerales.

La fijación biológica de nitrógeno, parece no ser tan determinante en la incorporación de nitrógeno al sistema, ya que la disponibilidad de materia orgánica y los altos niveles de amonio disponibles, disminuyen la presión para que estos organismos lleven a cabo innecesariamente un proceso que es tan energéticamente costoso.

En general es difícil establecer la relación entre la actividad enzimática del suelo (nitrogenasa y proteasa) y la población de microorganismos cultivables que desempeñan dicha función (fijadores biológicos de nitrógeno y proteolíticos), ya que estas pueden verse afectadas por

otros factores como por ejemplo el contenido de arcilla del suelo y quedar retenidas por varios años, por lo cual no reflejan el estado actual de la comunidad de cumple dicha función.

El estudio de los géneros de microorganismos fijadores de nitrógeno obtenidos a través de la ribotipificación y la secuenciación del gen 16s rRNA no presentan correspondencia, sin embargo, esto se constituye en una oportunidad para estudiar con más detalle la comunidad, ya que cada aproximación metodológica brinda información diferente que puede ser complementaria.

El análisis de los ribotipos de microorganismos fijadores de nitrógeno a diferencia de la aproximación de recuento en placa, logró describir una mayor cantidad de individuos asociados al proceso y establecer relaciones con la actividad nitrogenasa del suelo, por tanto, la aproximación independiente de cultivo, elimina el sesgo introducido por el medio de cultivo, que puede no permitir el óptimo desarrollo de algunos microorganismos que pueden ser determinantes para sustentar la función de fijación de nitrógeno en el suelo.

La pirosecuenciación es una aproximación metodológica robusta, que presenta gran utilidad para el análisis de las comunidades microbianas del suelo, así como para los microorganismos potencialmente relacionados con el ciclo del nitrógeno, ya que al analizar la proporción los diferentes grupos asociados a cada proceso (nitrificación, reducción de nitrato, denitrificación y fijación de nitrógeno) obtenidos mediante esta técnica, se logró establecer un agrupamiento de las fincas similar al obtenido con los parámetros físico químicos.

11. RECOMENDACIONES

A futuro, es importante validar las observaciones realizadas en el presente estudio, a través del establecimiento de ensayos en parcelas experimentales o microcosmos, que permitan hacer un seguimiento detallado de las transformaciones ambientales del nitrógeno, en respuesta a los puntos críticos determinados en el presente estudio.

Sería interesante considerar aproximarse al estudio de las comunidades funcionales, a través de una aproximación molecular robusta que evalúe genes funcionales relacionados con cada uno de los procesos del ciclo del nitrógeno, que permitan establecer afiliaciones filogenéticas y validar los resultados de las poblaciones identificadas como potencialmente relacionados con este proceso en el suelo.

Es importante además, establecer la relación en la dinámica de este elemento con la de otros importantes para el metabolismo de la planta, ya que algunos de los microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno deben tener efecto sobre otros elementos dada su versatilidad metabólica.

ANEXOS

Anexo 1. Información de la historia manejo agrícola de los cultivos sumunistrada por el agricultor para los suelos de estudio.

	Fertilización		Kg/ha aplicados			Produccion
	FERTILIZANTE CONPUESTO N-P-K	FERTILIZANTE A BASE DE ELEMENTOS MENORES	N	P	K	
Finca 1 San Isidro	Fertilizante Compuesto Amigo 14-30-1531-1 (700 kg/ha)	Nitromag (150 kg/ha)	135.5	210	105	608 bultos
Finca 2 Los Pinos	Rafos 12-24-12 (700 kg/ha)	Fosfacit Boro (150 kg/ha)	84	205.5	84	357 bultos
Finca 3 La Isila	Rafos 12-24-12 (900 kg/ha)	Nitromag (150 kg/ha)	145.5	216	108	370 bultos
Finca 4 Cascajal	Fedepapa Produccion 11-24-14 (900 kg/ha)	Dos aplicaciones foliares 1kg/Ha c/u	99	216	126	290 bultos
Finca 5 La Isla II	Fedepapa Produccion 11-24-14 (900 kg/ha)	Fosfacit Boro (150 kg/ha)	99	253.5	126	336 bultos
Finca 6 Montaña Pura	Bocachi: Estiercol vacuno, tierra, melaza, levadura, cascarilla de arroz, y carbon vegetal(cenizas de madera) compostado y se aplica a la siembra mas yeso, al aporque se aplica soil aid.					
Finca 7						
Cascajal						

Anexo 2. Géneros de microorganismos reportados en la literatura como asociados al ciclo del nitrógeno, considerados en el presente estudio.

1. Oxidadores de Amonio

Nitrosomonas
Nitrospira
Nitrosococcus
Nitrosovibrio

2. Oxidadores de Nitrato

Nitrobacter
Nitrococcus
Nitrospina
Nitrospira

3. Fijadores de Nitrógeno

Halobacterium
Methanobacterium
Methanothermus
Methanococcus
Methanoplanus
Methanosarcina
Methanobolus
Cyanothece
Gloeocapsa
Anabaena
Plectonema
Lynngbya
Spirulina
Gloeotheca
Nostoc
Calothrix
Oscillatoria
Chloroherpeton
Prosthecochloris
Chlorobium
Pelodictyon
Dyadobacter
Frankia
Arthrobacter
Propionibacterium
Streptomyces
Beijerinckia
Methylosinus
Rhodopseudomonas
Photorhizobium
Bradyrhizobium
Mycoplana
Rhodomicrobium
Mesorhizobium

Rhizobium
Sinorhizobium
Xanthobacter
Ancylobacter
Rhodobacter
Gluconacetobacter
Rhodopila
Azospirillum
Rhodospirillum
Derxia
Burkholderia
Herbaspirillum
Thiobacillus
Aquaspirillum
Azoarcus
Azospira
Pectobacterium
Rhodocyclus
Alcaligenes
Desulfobacter
Desulfovibrio
Paenibacillus
Clostridium
Heliobacillus
Heliobacterium
Heliospira
Desulfotomaculum
Propionispira
Bacillus
Acidithiobacillus
Chromatium
Thiocapsa
Thiocystis
Ectothiorhodospira
Klebsiella
Enterobacter
Escherichia
Erwinia
Pantoea
Methylbacter
Methylococcus
Methylomonas
Pseudomonas
Azotobacter
Azotococcus

Beggiatoa
Vibrio
Citrobacter
Synechococcus
Synechocystis
Chroococcidiopsis
Dermocarpa
Myxosarcina
Pleurocapsa
Xenococcus
Pseudoanabaena
Aphanizomenon
Cylindrospermum
Nodularia
Scytonema
Chlorogloeopsis
Fischerella
Geitlerinema
Stigonema
Prochloron
Campylobacter
Acetobacter
Agrobacterium
Azorhizobium
Chromobacterium
Methylocystis
Desulfosporosinus
Phormidium
Serratia
Spirochaeta
Treponema
Desulfomicrobium
Methanothermobacter
Methanopyrus
Tolypothrix
Wolinella
Methanobrevibacter
Desulfonema
Acetobacterium

4. Denitrificantes

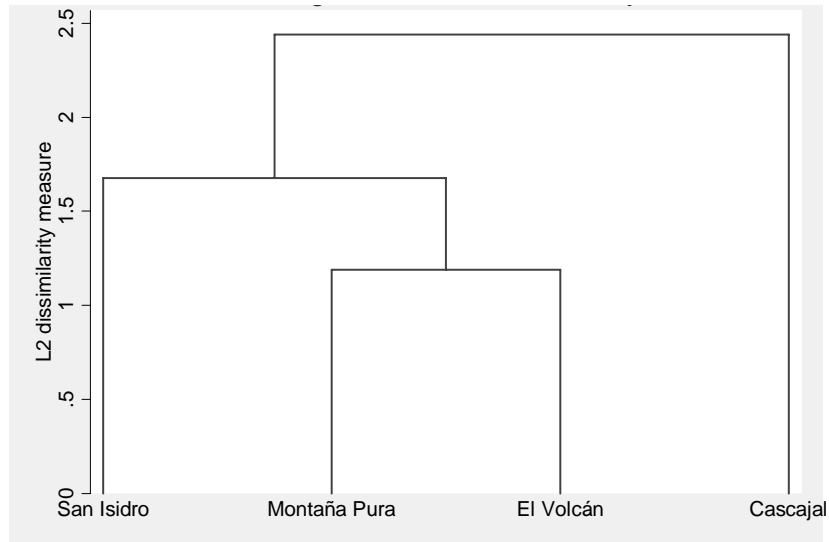
Alcaligenes
Agrobacterium
Aquaspirillum
Azospirillum
Bacillus

Blastobacter
Bradyrhizobium
Branhamella
Chromobacterium
Cytophaga
Flavobacterium
Flexibacter
Halobacterium
Hyphomicrobium
Kingella
Neisseria
Paracoccus
Propionibacterium
Pseudomonas
Rhizobium
Wolinella
Rhodopseudomonas
Nitrosomonas
Thiobacillus
Thiomicrospira

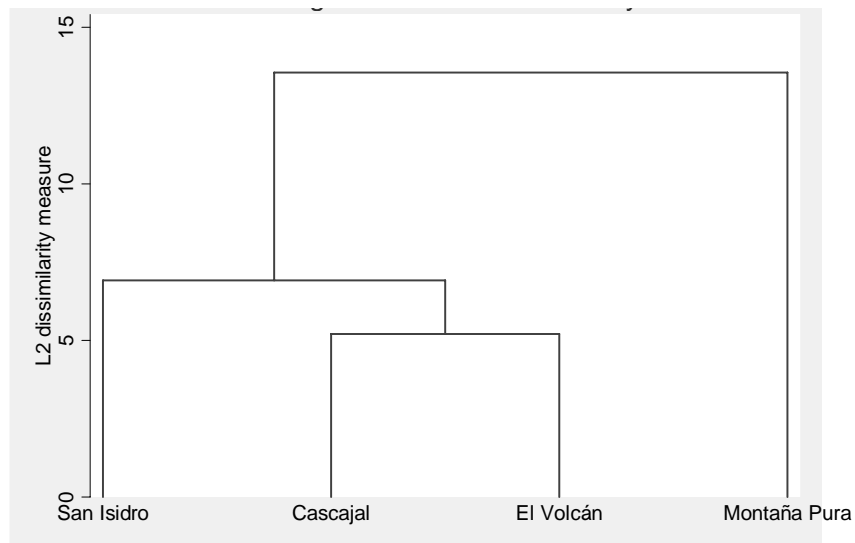
5. Desasimiladores de Nitrato a Amonio

Clostridium
Desulfovibrio
Selenomonas
Veillonella
Wolinella
Citrobacter
Enterobacter
Erwinia
Escherichia
Klebsiella
Photobacterium
Salmonella
Serratia
Vibrio
Campylobacter
Bacillus
Neisseria
Pseudomonas

Anexo 3. Análisis de clusters realizados para los suelos de estudio en función de diferentes variables.



A. Análisis de Clusters considerando los resultados para recuentos de microorganismos cultivables asociados al ciclo del nitrógeno.



B. Análisis de Clusters considerando la proporción general de ribotipos para cada phylum.

REFERENCIAS

- Acosta-Martinez, V., S. Dowd, Y. Sun, and V. Allen.** 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry* **40**:2762-2770.
- Acuña, O., W. Peña, E. Serrano, L. Pocasangre, F. Rosales, E. Delgado, J. Trejos, and A. Segura.** La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos. Reunión Internacional de ACORBAT. Vol 1: Conferencias y trabajo Resumidos. Bananicultura: un negocio sostenible. 222-223 p.
- Alexander, M. and F. E. Clark.** 1965. Nitrifying bacteria. *Methods of soil analysis, part 2* :1477-1483.
- Amora-Lazcano, E., M. M. Vazquez, and R. Azcon.** 1998. Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils* **27**:65-70.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J., and Struhl, K.** *Current Protocols in Molecular Biology* (2003). John Wiley and Sons. Inc.
- Bach, H. J. and J. C. Munch.** 2000. Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biology and Fertility of Soils* **31**:219-224.
- Barrera, L.** 1995. Suelos y Fertilización del Cultivo de la Papa. Seminario Fertilización de Cultivos. Sociedad Colombiana de Suelos. Noviembre. Págs 31-55.
- Barrios, E.** 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* **64**:269-285.
- Becerra-Sanabria, L. A., S. L. Navia-de Mosquera, and C. E. Núñez-López.** 2007. Efecto de niveles de fósforo y potasio sobre el rendimiento del cultivar Criolla Guaneña en el departamento de Nariño. *Revista Latinoamericana de la Papa* **14**:51-60.
- Behar, A., B. Yuval, and E. Jurkevitch.** 2005. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Molecular Ecology* **14**:2637-2643.
- Belser, L. W. and E. L. Schmidt.** 1978. Diversity in the ammonia-oxidizing nitrifier population of a soil. *Applied and environmental microbiology* **36**:584.
- Belser, L. W.** 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Annual reviews in microbiology* **33**:309-333.
- Bouwman, A. F., K. W. Van der Hoek, and J. G. J. Olivier.** Uncertainties in the global source distribution of nitrous oxide. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **100**.
- Briar, S. S., P. S. Grewal, N. Somasekhar, D. Stinner, and S. A. Miller.** 2007. Soil nematode community, organic matter, microbial biomass and nitrogen dynamics in field plots transitioning from conventional to organic management. *Applied Soil Ecology* **37**:256-266.

Bulluck, L. R. 2002. Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Applied Soil Ecology* **19**:147-160.

Castro H. Balance y prospectiva de la investigación en el campo de la fertilización para el sistema de producción de papa en Colombia. Memorias I Taller Nacional sobre suelos, fisiología y nutrición vegetal en el cultivo de la papa. Bogotá, Colombia. 31 – 44.

CEVIPAPA. 2004. Centro virtual de investigación de la cadena agroalimentaria de la papa. <http://www.cevipapa.org.co>. Consulta: Marzo 2009.

Chakravorty, S., D. Helb, M. Burday, N. Connell, and D. Alland. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **69**:330-339.

Chelius, M. K. and E. W. Triplett . 2000. *Dyadobacter fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative bacterium isolated from surface-sterilized *Zea mays* stems. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **50**:751.

Chen, W. M., L. Moulin, C. Bontemps, P. Vandamme, G. Bena, and C. Boivin-Masson. 2003. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by beta-Proteobacteria Is Widespread in Nature. *Journal of bacteriology* **185**:7266.

Chu, H., T. Fujii, S. Morimoto, X. Lin, K. Yagi, J. Hu, and J. Zhang. 2007. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and environmental microbiology* **73**:485.

DANE. 2002. I Censo Nacional del Cultivo de la Papa.

Elshahed, M. S., N. H. Youssef, Q. Luo, F. Z. Najjar, B. A. Roe, T. M. Sisk, S. I. Buhring, K. U. Hinrichs, and L. R. Krumholz. 2007. Phylogenetic and metabolic diversity of Planctomycetes from anaerobic, sulfide-and sulfur-rich Zedler Spring, Oklahoma. *Applied and environmental microbiology* **73**:4707.

Enwall, K., L. Philippot, and S. Hallin. 2005. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and environmental microbiology* **71**:8335.

Espinal C., Martínez H. 2003. La Cadena de papa en Cundinamarca frente a las negociaciones comerciales hemisféricas. Corporación Latinoamericana Misión Rural, Gobernación de Cundinamarca. Dirección de Planeación. Bogotá.

Espinal C., Martínez H., Pinzón N., Barrios C. 2005. La cadena de la papa en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de Trabajo No. 54. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas, Colombia.

- Fazzolari, B. Nicolardot, and J. C. Germon.** 1998. Simultaneous effects of increasing levels of glucose and oxygen partial pressures on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in repacked soil cores. *European journal of soil biology* **34**:47-52.
- Ferguson, S. J.** 1998. Nitrogen cycle enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**:182-193.
- Ferrera-Cerrato, R.** 2007. *Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, Micro y Macrofauna, control biológico y planta-microorganismo.* Trillas.
- Filion, M., R. C. Hamelin, L. Bernier, and M. St-Arnaud.** 2004. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. *Applied and environmental microbiology* **70**:3541.
- Freitag, T. E., L. Chang, C. D. Clegg, and J. I. Prosser.** 2005. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Applied and environmental microbiology* **71**:8323.
- Fuka, M. M., M. Engel, A. Gattinger, U. Bausenwein, M. Sommer, J. C. Munch, and M. Schloter.** 2008. Factors influencing variability of proteolytic genes and activities in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry* **40**:1646-1653.
- Galloway, J. N.** 1995. Acid deposition: perspectives in time and space. *Water, Air, & Soil Pollution* **85**:15-24.
- Galloway, J. N., A. R. Townsend, J. W. Erisman, M. Bekunda, Z. Cai, J. R. Freney, L. A. Martinelli, S. P. Seitzinger, and M. A. Sutton.** 2008. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* **320**:889.
- Gastal, F. and G. Lemaire.** 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* **53**:789.
- Goloboanin, D. D.** 2004. Principal component analysis for soil contamination with PAHs. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **72**:219-223.
- García J.C., Cubillos-Ruíz A., Uribe D., Osorio C., Sierra R., Grajales A., Restrepo S., Junca H., Del Portillo P.** 2009. Pyrosequencing-Based Analyses of the Microbial Diversity in Contrasting Agricultural Soils in the Neotropical Colombian Andes. Datos sin Publicar.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, and R. M. Goodman.** 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology* **5**:R245-R249.
- Handelsman, J., Tiedje, J., Alvarez-Cohen, L., Ashburner, M., Cann, I. K. O., DeLong, E. E., Doolittle, W. F., Fraser-Liggett, C. M., Godzik, A., and Gordon, J. I.** *The New Science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet.* 2007. Washington, DC: The National Academies Press.

- Hansel, C. M., S. Fendorf, P. M. Jardine, and C. A. Francis.** 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and environmental microbiology* **74**:1620.
- Harrison, K. A., R. Bol, and R. D. Bardgett.** 2007. Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. *Ecology* **88**:989-999.
- Hartmann, A. and R. H. Burris.** 1987. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of bacteriology* **169**:944.
- Hayatsu, M., T. Kanako, and M. Saito.** 2008. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science & Plant Nutrition* **54**:33-45.
- Horiba, Y., S. T. Khan, and A. Hiraishi.** 2005. Characterization of the microbial community and culturable denitrifying bacteria in a solid-phase denitrification process using poly (ϵ -caprolactone) as the carbon and energy source. *Microbes and Environments* **20**:25-33.
- Howe, J. and M. Wagner.** 1996. The effect of papermill wastewater and organic amendments of sodium accumulation by potted cottonwoods. *Environmental Pollution* **92**:113-118.
- Jackson, L. E., M. Burger, and T. R. Cavagnaro.** 2008. Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services.
- Janssen, P. H.** 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology* **72**:1719.
- Jenkinson, D. S.** 2001. The impact of humans on the nitrogen cycle, with focus on temperate arable agriculture. *Plant and Soil* **228**:3-15.
- Jetten, M. S. M.** 2008. The microbial nitrogen cycle. *Environmental microbiology* **10**:2903-2909.
- Jones, R. T., M. S. Robeson, C. L. Lauber, M. Hamady, R. Knight, and N. Fierer.** 2009. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *The ISME Journal*.
- Kirk, J. L., L. A. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J. N. Klironomos, H. Lee, and J. T. Trevors.** 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* **58**:169-188.
- Kleiner, D.** 1976. Ammonium uptake and metabolism by nitrogen fixing bacteria. *Archives of Microbiology* **111**:85-91.
- Kramer, S. B., J. P. Reganold, J. D. Glover, B. J. M. Bohannon, and H. A. Mooney.** 2006. Reduced nitrate leaching and enhanced denitrifier activity and efficiency in organically fertilized soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:4522.
- Kunito, T., K. Saeki, S. Goto, H. Hayashi, H. Oyaizu, and S. Matsumoto.** 2001. Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long-term sludge-amended soils. *Bioresource technology* **79**:135-146.

- Laanbroek, H. J. and S. Gerards.** 1991. Effects of organic manure on nitrification in arable soils. *Biology and Fertility of Soils* **12**:147-153.
- Ladd, J. N. and J. H. A. Butler.** 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry* **4**:19-30.
- Lee, S. H., J. O. Ka, and J. C. Cho.** 2008. Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *FEMS microbiology letters* **285**:263-269.
- Leininger, S., T. Urich, M. Schloter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster, and C. Schleper.** 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**:806-809.
- Lozano A.** 1998. Guía para la determinación de la actividad nitrogenasa en cultivos de microorganismos diazotrofos. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá- Departamento de Química. 7 p.
- Malik, K. A., R. Bilal, S. Mehnaz, G. Rasul, M. S. Mirza, and S. Ali.** 1997. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant and Soil* **194**:37-44.
- Mansfield, T. A., K. W. T. Goulding, and L. J. Sheppard.** 1998. Disturbance of the nitrogen cycle. *New Phytologist* **139**:1-234.
- Mardis, E. R.** 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **9**: 387-402
- Marshall, K. C.** 1975. Clay mineralogy in relation to survival of soil bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **13**:357-373.
- Martin-Laurent, F., L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J. C. Germon, G. Soulas, and G. Catroux.** 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and environmental microbiology* **67**:2354.
- Martínez, H.** 2006 La Cadena De La Papa En Colombia. Una Mirada Global De Su Estructura y Dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. <http://www.agrocadenas.gov.co/agrocadenas@iica.int>. 38p. Consulta: Abril de 2009.
- McCrary, M. H.** 1918. Tables for rapid interpretation of fermentation tube results. *Publ.Health Journ.Toronto*.
- McKenzie, V. J. and A. R. Townsend .** 2007. Parasitic and infectious disease responses to changing global nutrient cycles. *EcoHealth* **4**:384-396.
- Monokrousos, N., E. M. Papatheodorou, J. D. Diamantopoulos, and G. P. Stamou.** 2006. Soil quality variables in organically and conventionally cultivated field sites. *Soil Biology and Biochemistry* **38**:1282-1289.

- Morozova, O. and M. A. Marra.** 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* **92**:255-264.
- Mosier, A., C. Kroeze, C. Nevison, O. Oenema, S. Seitzinger, and O. van Cleemput.** 1998. Closing the global N₂O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **52**:225-248.
- Mosquera, C. J.** 2003. La Modesta Papa Criolla. En: [http:// www.angelfire.com](http://www.angelfire.com). Consulta: Enero de 2009.
- Muñoz, L. A. and A. M. Lucero.** 2008. Efecto de la fertilización orgánica en el cultivo de papa criolla *Solanum phureja*. *Agronomía Colombiana* **26**:340-346.
- Mulvaney, R. L., S. A. Khan, and C. S. Mulvaney.** 1997. Nitrogen fertilizers promote denitrification. *Biology and Fertility of Soils* **24**:211-220.
- Muruganandam, S., D. W. Israel, and W. P. Robarge.** 2009. Activities of nitrogen-mineralization enzymes associated with soil aggregate size fractions of three tillage systems. *Soil Science Society of America Journal* **73**:751.
- Mäder, P., A. Fliessbach, D. Dubois, L. Gunst, P. Fried, and U. Niggli.** 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* **296** :1694.
- Nannipieri, P., J. Ascher, M. T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, and G. Renella.** 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **54**:655-670.
- Nicol, G. W. and C. Schleper.** 2006. Ammonia-oxidising *Crenarchaeota*: important players in the nitrogen cycle? *TRENDS in Microbiology* **14**:207-212.
- Nocker, A., M. Burr, and A. K. Camper.** 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial ecology* **54**:276-289.
- Ñústez, C. E.** 2001. La papa criolla (*Solanum phureja*): Un Cultivo Para Destacar en Colombia. *Boletín de la papa* (3), 25, [http:// www.redepapa.org.html](http://www.redepapa.org.html). 246 p. Consulta: Junio de 2008.
- Oblinger, J. L. and J. A. Koburger.** 1975. Understanding and teaching the most probable number technique. *Journal of Milk and Food technology* **38**:540-545.
- Palacios, C. A., S. Jaramillo, L. H. González, and J. M. Cotes.** 2008. Efecto de la fertilización sobre la calidad de la papa para procesamiento en dos suelos antioqueños con propiedades ándicas. *Agronomía Colombiana* **26**:487-496.
- Papen, H. and R. Von Berg.** 1998. A most probable number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant and Soil* **199**:123-130.
- Philippot, L. and S. Hallin.** 2005. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology* **8**:234-239.

- Pimm, S. L.** 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature* **307**:321-326.
- Pochon, J. and P. Tardieux.** 1962. *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Editions de la Tourelle.
- Porras, P.** 2000. Guía para la papa criolla. Clon 1. En: *Papas colombianas con el mejor entorno ambiental*, 2 edición. FEDEPAPA, pp. 44-47, 65-69.
- Portugal, V. O. and L. I. A. Gómez.** 1998. Microorganismos y biodiversidad. *Terra* **16**: 289 – 292
- Potts, D. L., T. E. Huxman, B. J. Enquist, J. F. Weltzin, and D. G. Williams.** 2006. Resilience and resistance of ecosystem functional response to a precipitation pulse in a semi-arid grassland. *Journal of Ecology* **94**:23-30.
- Purkhold, U., M. Wagner, G. Timmermann, A. Pommerening-Roser, and H. P. Koops.** 2003. 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **53**:1485.
- Pérez, L. C., L. E. Rodríguez, and M. I. Gómez.** 2008. Efecto del fraccionamiento de la fertilización con N, P, K y mg y la aplicación de los micronutrientes B, Mn y Zn en el rendimiento y calidad de papa criolla (*Solanum phureja*) variedad Criolla Colombia. *Agronomía Colombiana* **26**:477-486.
- Ramirez, C.** Efecto de las prácticas agrícolas sobre la microflora del suelo: Oportunidades en la fitoprotección. X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales , 8-12. 1996.
- Ranjard, L., F. Poly, and S. Nazaret.** 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* **151**:167-177.
- R Development Core Team.** 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rennie, R. J.** 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian journal of microbiology* **27**:8.
- Richardson, D. J. and N. J. Watmough.** 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**:207-219.
- Rigby, D. and D. C. Ceres.** 2001. Organic farming and the sustainability of agricultural systems. *Agricultural Systems* **68**:21-40.
- Robertson, L. A. and J. G. Kuenen .** 1988. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: oxygen uptake and enzyme studies. *Microbiology* **134**:857.

Roesch, L. F. W., R. R. Fulthorpe, A. Riva, G. Casella, A. K. M. Hadwin, A. D. Kent, S. H. Daroub, F. A. O. Camargo, W. G. Farmerie, and E. W. Triplett. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal* **1**:283-290.

Saha, S., K. A. Gopinath, B. L. Mina, and H. S. Gupta. 2008. Influence of continuous application of inorganic nutrients to a Maize-Wheat rotation on soil enzyme activity and grain quality in a rainfed Indian soil. *European journal of soil biology* **44** :521-531.

Sakurai, M., K. Suzuki, M. Onodera, T. Shinano, and M. Osaki. 2007. Analysis of bacterial communities in soil by PCR-DGGE targeting protease genes. *Soil Biology and Biochemistry* **39**:2777-2784.

Sarathchandra, S. U. 1978. Nitrification activities and the changes in the populations of nitrifying bacteria in soil perfused at two different H-ion concentrations. *Plant and Soil* **50**:99-111.

Schimel, J. P. and J. Bennett. 2008. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm.

Schloss, P. D. and J. Handelsman. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and environmental microbiology* **71**:1501.

Schlöter, M., O. Dilly, and J. C. Munch. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **98**:255-262.

Schlöter, M., H. J. Bach, S. Metz, U. Sehy, and J. C. Munch. 2003. Influence of precision farming on the microbial community structure and functions in nitrogen turnover. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **98**:295-304.

Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer, and G. Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and environmental microbiology* **67**:4742.

Smil, V. 1997. Global population and the nitrogen cycle. *Scientific American* **277**:76-81.

Smith, R. L., C. Van Baalen, and F. R. Tabita. 1987. Alteration of the Fe protein of nitrogenase by oxygen in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain CA. *Journal of bacteriology* **169**:2537.

Soares, R. A., L. F. W. Roesch, G. Zanatta, F. A. de Oliveira Camargo, and L. M. P. Passaglia. 2006. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied Soil Ecology* **33**:221-234.

Sogin, M. L., H. G. Morrison, J. A. Huber, D. M. Welch, S. M. Huse, P. R. Neal, J. M. Arrieta, and G. J. Herndl. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ôrare biosphereö. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:12115.

StataCorp. 2005. *Stata Statistical Software: Release 9*. College Station, TX: StataCorp LP.

Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, and Zuberer DA 2005. Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, New Jersey,

Teske, A., E. Alm, J. M. Regan, S. Toze, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl. 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of bacteriology* **176**:6623.

Tiedje, J. M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Biology of anaerobic microorganisms* **33**:179-244.

Tiedje, J. M., S. Asuming-Brempong, K. Nnsslein, T. L. Marsh, and S. J. Flynn. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* **13**:109-122.

Torres, M. V. and L. M. Lizarazo . 2006. Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). *Agronomía Colombiana* **24**:317-325.

Torsvik, V. and L. Øvreas. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **5**:240-245.

Tripathi, A. K., T. Nagarajan, S. C. Verma, and D. L. Rudulier. 2002. Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *Azospirillum brasilense* Sp7 under salinity stress. *Current Microbiology* **44**:363-367.

Urich, T., A. Lanzén, J. Qi, D. H. Huson, C. Schleper, and S. C. Schuster. 2008. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PLoS One* **3**.

van Cleemput, O. and P. Boeckx. 2006. Nitrogen and its Transformations. *Encyclopedia of Soil Science* **2**.

Varela, A., M. P. Aguilera, B. E. Vélez, and C. Flórez. Evaluación preliminar de grupos funcionales bacterianos como indicadores de calidad de suelos en zona cafetera. En: *Memorias Taller sobre indicadores de calidad del suelo*. Palmira: Centro Internacional de Agricultura Tropical 1-10p.

Villamil H. J., Fisiología de la Nutrición en Papa. *Memorias I Taller Nacional sobre suelos, fisiología y nutrición vegetal en el cultivo de la papa*. Bogotá, Colombia. 17 -26.

Villareal H., Porras P., Santa A., Logoeyte J., Muñoz D. 2007. Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia. <http://www.antioquia.gov.co/organismos/agricultura/papa/cadena%20papa/INVESTIGACIONES/Estudio%20del%20comportamiento%20de%20los%20costos%20de%20produccion.pdf>. Consulta: Abril 2009.

Vitousek, P. M., J. D. Aber, R. W. Howarth, G. E. Likens, P. A. Matson, D. W. Schindler, W. H. Schlesinger, and D. G. Tilman. 2008. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences.

Wagner, M. and M. Horn. 2006. The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Current opinion in biotechnology* **17**:241-249.

Wang, F., H. Zhou, J. Meng, X. Peng, L. Jiang, P. Sun, C. Zhang, J. D. Van Nostrand, Y. Deng, and Z. He. 2009. GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:4840.

Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology* **73**:5261.

Wartiainen, I., T. Eriksson, W. Zheng, and U. Rasmussen. 2008. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*.

Wright, S. F. and R. W. Weaver. 1981. Enumeration and identification of nitrogen-fixing bacteria from forage grass roots. *Applied and environmental microbiology* **42**:97.

Yin, S. X., D. Chen, L. M. Chen, and R. Edis. 2002. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry* **34**:1131-1137.

Yoch, D. C. 1979. Manganese, an essential trace element for N₂ fixation by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*: role in nitrogenase regulation. *Journal of bacteriology* **140**:987.

Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biological nitrogen fixation* 43-86.

Zakhia, F., H. Jeder, A. Willems, M. Gillis, B. Dreyfus, and P. de Lajudie. 2006. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial ecology* **51**:375-393.

Zhou, Z., N. Takaya, A. Nakamura, M. Yamaguchi, K. Takeo, and H. Shoun. 2002. Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *Journal of Biological Chemistry* **277**:1892.