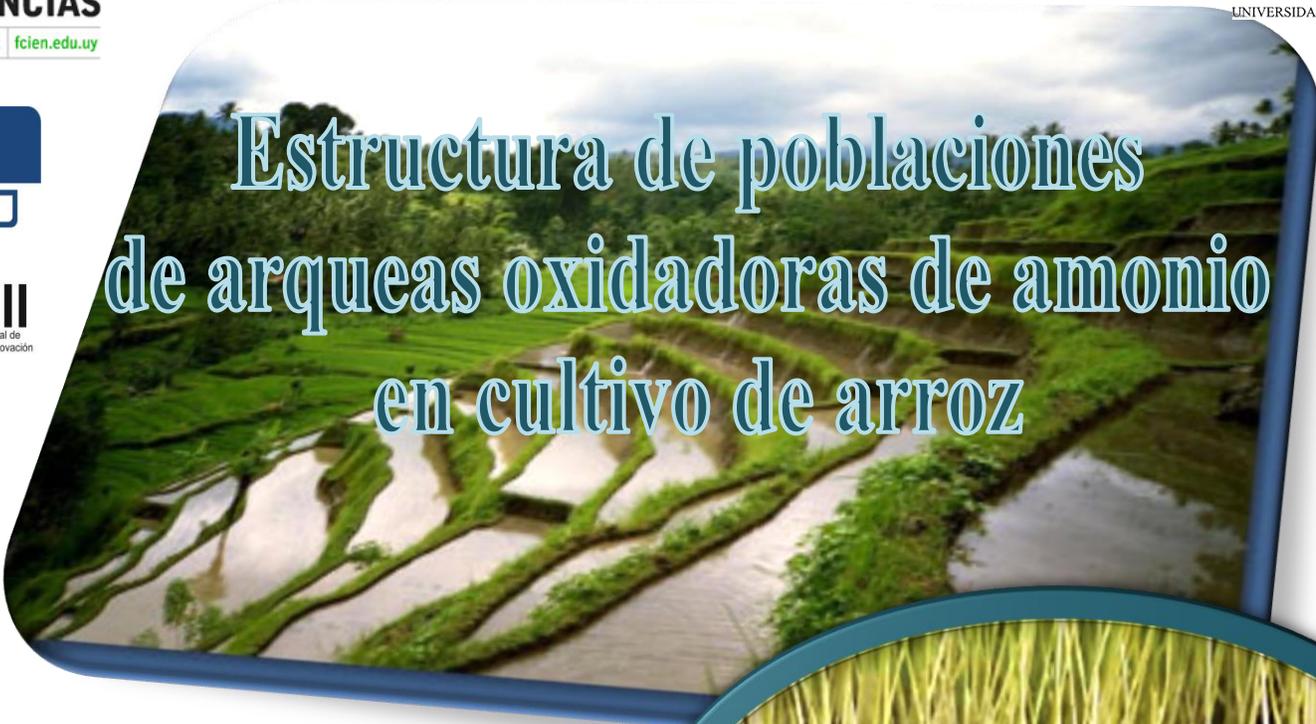




FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA



Estructura de poblaciones de arqueas oxidadoras de amonio en cultivo de arroz

Tesina de Grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Profundización Ecología

Tania Trasante

Orientador: Gastón Azziz

Laboratorio de Microbiología

Unidad de Biología Vegetal,

Facultad de Agronomía, UdelaR

2014



Tabla de Contenidos

Agradecimientos	1
Resumen	2
Antecedentes y Justificación	3
Los gases de efecto invernadero y la agricultura	3
Procesos microbianos de producción de CH ₄ y N ₂ O	5
El cultivo de arroz y las emisiones de GEI	9
Producción de arroz y emisiones de GEI en Uruguay	11
Impacto de prácticas agrícolas sobre las emisiones de N ₂ O	12
Estudio de comunidades de microorganismos del suelo	14
Objetivos	16
Hipótesis	17
Materiales y Métodos	18
Características fisicoquímicas del suelo	18
Diseño experimental en invernáculo	18
Muestreo de suelo	19
Extracción de ADN	19
Construcción de una biblioteca de ADN del gen <i>amoA</i> arqueano	20
T-RFLP del gen <i>amoA</i> de arqueas	23
1) Amplificación del gen <i>amoA</i> arqueano y digestión con enzima de restricción <i>MboI</i>	23
2) Análisis de fragmentos	24
Análisis estadístico	25
Resultados	26
Extracción de ADN	26
Construcción y análisis de una biblioteca de ADN del gen <i>amoA</i> arqueano	26
T-RFLP del gen <i>amoA</i> de arqueas	28
1) Amplificación del gen <i>amoA</i> arqueano y digestión con enzima de restricción <i>MboI</i>	28
2) Análisis de fragmentos	29
Análisis estadístico multivariado	37

Discusión	42
Biblioteca de ADN del gen <i>amoA</i> arqueano	42
Estructura poblacional de AOA	45
Conclusiones y Perspectivas	52
Bibliografía	53
ANEXO	57

Agradecimientos

A Gastón Azziz, por su inmensa e invaluable ayuda para terminar a tiempo este trabajo de grado, por abrirme las puertas a un trabajo en equipo, y por su eterna paciencia y buena disposición en todo momento.

A la ANII, por el apoyo económico sin el cual hubiese sido muy difícil terminar en tiempo y forma esta pasantía de grado.

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología: Pilar Irisarri, Andrea Rodríguez, Gabriela Illarze y Germán Pérez, por prestarme su ayuda siempre que la precisé, por permitirme formar parte de un equipo de trabajo a pesar de mi inexperiencia, por todas las oportunidades y consejos brindados que me enseñaron un montón, y por la buena onda del día a día.

A mis compañeras de laboratorio: Silvina, Pamela y Victoria, por compartir todos estos momentos conmigo, brindándome su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A Silvia Batista y Adriana Montañez, por corregirme la tesis en tiempo record para que pudiera irme.

A mi familia, por soportarme incondicionalmente durante todo este proceso académico.

A mis amigos por acompañarme en todos estos años de estudio, en la vida cotidiana dentro y fuera de la facultad.

A las Amis, que siempre me estuvieron apoyando con cariño en cada paso que di.

Resumen

Las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI) han tomado un papel central en las investigaciones científicas del mundo entero debido a sus consecuencias sobre el cambio climático. Algunos de estos GEI como el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O) son principalmente producidos por el sector agropecuario, de ahí que los investigadores relacionados con ésta área centren sus esfuerzos en comprender las dinámicas de estas emisiones. El N₂O es un gas 310 veces más potente que el CO₂ en la generación del efecto invernadero, y la producción agrícola es una de las principales causantes de las emisiones de este gas en el mundo; en particular, la producción de arroz es responsable de cerca de 35% de las emisiones de N₂O en nuestro país. En Uruguay, la exportación del arroz se ha vuelto un rubro económico destacable, exportándose el 90% de la producción. Hasta el momento se ha indagado sobre la dinámica de las emisiones de N₂O en arrozales en nuestro país, pero aún se desconoce la composición y dinámica poblacional de las comunidades de microorganismos responsables de dichas emisiones. El presente estudio se propuso analizar las respuestas de la comunidad de arqueas oxidadoras de amonio (AOA) frente a modificaciones experimentales en invernáculo, en el cultivar de arroz utilizado, y en el manejo de agua aplicado. Se compararon las variaciones poblacionales a lo largo de un ciclo de cultivo mediante el análisis de T-RFLP del gen *amoA* arqueano. Además se construyó una biblioteca génica del gen de estudio, con el fin de validar los cebadores utilizados, y permitió una primera aproximación a la variabilidad de AOA en las muestras experimentales. Se pudieron apreciar diferencias significativas de la estructura poblacional según el cultivar de arroz y según la etapa de crecimiento en que se encontraba el cultivo. No obstante, no se pudieron detectar estas diferencias en el caso del manejo de agua del cultivo. Es necesario ahondar en el estudio de esta comunidad y de su análogo bacteriano (AOB), en más de un ciclo de cultivo para así poder determinar con mayor precisión la dinámica de estas comunidades y su relación con las emisiones de N₂O. La comprensión de estas dinámicas poblacionales permitirá en un futuro controlar las emisiones de GEI en el país, agregándole valor comercial al producto de exportación, al constituir un cultivo de mayor sustentabilidad, destacándose a nivel internacional.

Antecedentes y Justificación

Los gases de efecto invernadero y la agricultura

Las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), tales como CO₂, CH₄, y N₂O, han aumentado considerablemente desde tiempos pre-industriales, con un incremento del 70% entre 1970 y 2004 (IPCC, 2007). Varios autores contribuyentes al Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) afirman que el aumento en las concentraciones atmosféricas de estos gases tiene incidencia directa sobre el cambio climático global, debido a que son gases de alta permanencia en la atmósfera. Sus principales fuentes de emisión son de origen antrópico, tales como el uso de combustibles fósiles, los cambios en el uso del suelo y la actividad agropecuaria (IPCC, 1996). Este cambio climático global provocaría alteraciones en las zonas actuales de vegetación, cambios en la cantidad y distribución de las precipitaciones, derretimiento de glaciares, aumento en el nivel del mar, inundaciones de las zonas costeras, y por ende tendrán inevitablemente consecuencias a nivel agronómico, afectando económicamente a todos los países.

El sector agropecuario es uno de los que tendrán mayores impactos debido al cambio climático: según las predicciones realizadas por la comunidad científica, la productividad agropecuaria disminuiría en algunas regiones y aumentaría en otras; y los impactos más negativos se verían en las zonas tropicales y subtropicales (Reilly et al., 1996). Las consecuencias de estos cambios serían de gran magnitud ya que en esas regiones se encuentran algunos de los ecosistemas más frágiles del planeta denominados “Hot Spots” de biodiversidad. Además en estas mismas regiones se encuentra la mayor parte de los países menos desarrollados, y por lo tanto más vulnerables a efectos negativos sobre su sector productivo.

Existe una relación bidireccional entre los procesos que ocurren en los suelos, ya sean estos bióticos o abióticos, y el cambio climático. Por un lado, los procesos de producción y consumo de GEI, afectan las concentraciones de estos gases en la atmósfera. Pero se debe tener en cuenta que el calentamiento global afecta a su vez dichos procesos a

través de los cambios en la temperatura, la humedad y la competencia por los nutrientes; afectando las respuestas de los organismos que en dicho suelo se encuentran y que inciden sobre la producción y consumo de los gases (Mosier, 1998).

El metano (CH_4) y el óxido nitroso (N_2O) son responsables de alrededor del 25% del aumento del calentamiento global, y son principalmente producidos por el sector agropecuario (Figura 1).

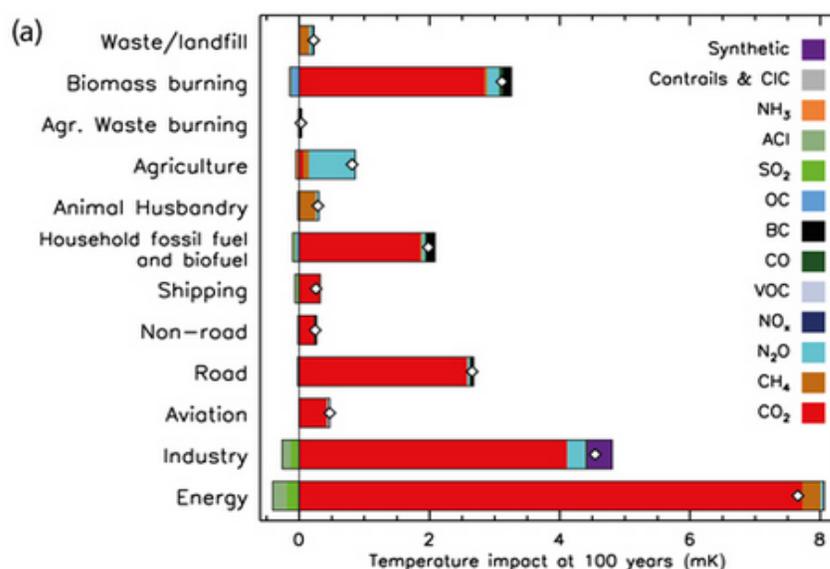


Figura 1. Aportes relativos de GEI según la actividad antropogénica considerada. Tomado de <http://blogs.scientificamerican.com/observations/2014/01/31/12-graphics-that-contain-everything-you-need-to-know-about-climate-change>.

Se estima que la agricultura contribuye en 50% y 85% al total de las emisiones antropogénicas de CH_4 y N_2O respectivamente (IPCC, 2007), y se predice un aumento de entre 35 y 60% para el año 2030, debido al incremento de la aplicación de fertilizantes nitrogenados (FAO, 2003). Si bien la carga global de N_2O en la atmósfera es menor que la de CH_4 , el primero tiene un potencial de calentamiento global 310 veces mayor que el CO_2 , mientras que el CH_4 es 21 veces más potente que el CO_2 (EPA, 2006). Además, el N_2O es un gas que posee un tiempo de permanencia en la atmósfera de aproximadamente 120 años por lo que sus consecuencias tendrán efectos por varias generaciones, y el único sumidero significativo que se conoce, es su pasaje hacia la estratósfera dónde es parcialmente

fotolizado a NO, el cual reacciona con el ozono, formando NO_2^- y O_2 ; adelgazando así la capa de ozono (Mosier, 1998).

Procesos microbianos de producción de CH_4 y N_2O

El CH_4 en el suelo es originado fundamentalmente por la descomposición anaeróbica de materia orgánica, llevada a cabo por microorganismos pertenecientes al Dominio *Archaea*. Los organismos metanogénicos realizan la última etapa de la descomposición anaerobia de los compuestos orgánicos. Los pasos previos de la descomposición son realizados por diferentes organismos tales como los fermentadores y las bacterias acetogénicas, que producen distintos sustratos orgánicos simplificados, los cuáles son consumidos por los organismos metanogénicos (Boone et al., 1993).

Existen tres tipos de procesos metanogénicos según el sustrato utilizado: la metanogénesis autótrofa (o hidrogenótrofa), la metilótrofa y la acetótrofa; se realizan a partir de CO_2 y H_2 , grupos metilo (CH_3) o acetato (CH_3COO^-) respectivamente (Figura 2). Dichos procesos se realizan según la disponibilidad en el suelo de los sustratos y sobre todo según su rendimiento energético, lo cual está jerarquizado según el siguiente orden decreciente: O_2 , NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} y SO_4^{2-} (García et al., 2000).

La metanogénesis hidrogenótrofa implica la reducción de CO_2 (aceptor de electrones) a la vez que se oxida el H_2 para producir $\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$. La metanogénesis metilótrofa utiliza el metanol ($\text{CH}_3\text{-OH}$) como dador de electrones para transformar grupos metilos en metano. Mientras que en la metanogénesis acetótrofa, el metano se obtiene a partir de la activación del acetato a acetyl-coA. (García et al., 2000).

El metano generado es liberado a la atmósfera por tres vías principales: por burbujeo en el agua de inundación, por difusión desde la superficie del agua de riego, y por difusión

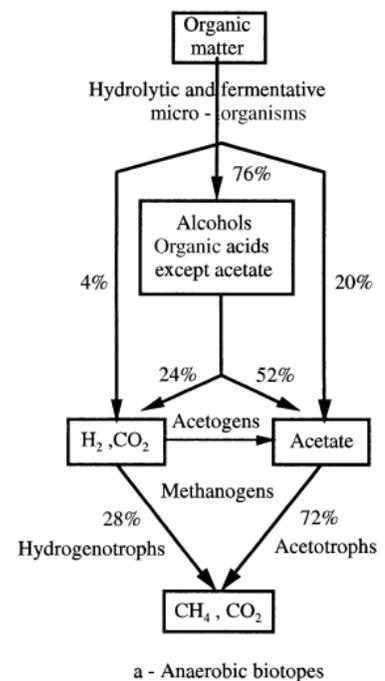


Figura 2. Diagrama esquemático de las posibles rutas metabólicas de la metanogénesis en ambientes anaerobios.

Adaptado de García et al. (2000)

a través de los tejidos de las plantas durante su crecimiento. Esta última vía es la más importante en cultivos de arroz ya que se estima que un 90% del metano producido se libera a la atmósfera a través del aerénquima de las plantas, lo cual genera que las emisiones varíen mucho a lo largo del estadio de crecimiento del cultivo (Baethgen & Martino, 2000)

Las emisiones de N_2O provenientes del suelo son producto de la actividad metabólica realizada por determinadas comunidades microbianas que allí habitan. Dichas emisiones son principalmente producidas por organismos nitrificantes y desnitrificantes. La nitrificación es un proceso aerobio que genera N_2O como sub-producto cuando la provisión de oxígeno se ve limitada; mientras que la desnitrificación se activa cuando el consumo de oxígeno origina microambientes anóxicos dentro del perfil del suelo (Smith et al., 2003).

La nitrificación consiste en la oxidación del amonio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-) pasando por nitrito (NO_2^-). Bajo condiciones aerobias, el grupo de organismos más relevantes involucrados en la nitrificación es el de las bacterias quimioautolitótrofas aerobias, que incluye las oxidadoras de NH_4^+ y las oxidadoras de NO_2^- . Para estas bacterias, la oxidación del nitrógeno inorgánico es utilizada como fuente de energía metabólica. La nitrificación también puede ser llevada a cabo por bacterias heterótrofas, hongos y algas en presencia de oxígeno, aunque éstos procesos pueden ser ecológicamente insignificantes en comparación con la nitrificación de las bacterias autótrofas (Fiencke et al., 2005). En la primera etapa de la nitrificación, la oxidación del NH_4^+ , puede ocurrir la formación de N_2O como sub-producto de la reacción (cuando el NH_4^+ no ha sido completamente oxidado), de ahí la relevancia de esta reacción en particular para las emisiones de N_2O (Conrad, 1996).

La oxidación de NH_4^+ a NO_2^- es catalizada por dos enzimas: la amonio monooxigenasa (AMO) y la hidroxilamina oxidorreductasa (HAO). La enzima AMO cataliza el proceso por el cual se obtiene el intermediario hidroxilamina (NH_2OH) mediante la oxidación de NH_4^+ ; mientras que la enzima HAO se encarga de la oxidación de hidroxilamina a NO_2^- (Figura 3). AMO está compuesta por 3 polipéptidos codificados por sus correspondientes tres genes denominados *amoA*, *amoB* y *amoC*. El gen *amoA* codifica para una proteína hidrofóbica de 32 kDa que consiste en 4 a 5 secuencias transmembranas, a la cual se le atribuye la función catalítica de la oxidación de NH_4^+ (Fiencke et al., 2005).

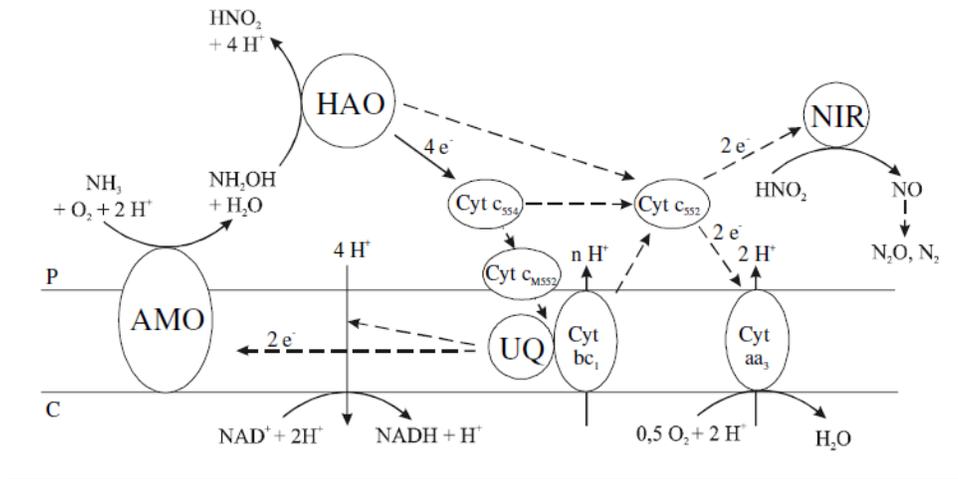


Figura 3. Modelo de la cadena de transporte de electrones de *Nitrosomonas europaea*,
P= lado periplasmático de la membrana; C= lado citoplasmático de la membrana;
AMO= amonio monooxigenasa; HAO= hidroxilamina oxidoreductasa; NIR= nitrito reductasa;
UQ= ubiquinona; Cyt= citocromo
Tomado de Fiencke et al. (2005)

Algunos oxidadores de NH_4^+ , los nitrificadores desnitrificantes, usan el NO_2^- producido como aceptor final de electrones en condiciones restrictivas de oxígeno, reduciéndolo a NO, y luego a N_2O , liberándose en forma gaseosa a la atmósfera, tal como se muestra en la figura 3 (Fiencke et al., 2005).

El producto final de la nitrificación, el NO_3^- , es una molécula móvil que puede difundir rápidamente hacia aguas subterráneas, lo cual deriva muchas veces en la eutrofización de los ecosistemas afectados. Algunos organismos asimilan el NO_3^- como fuente de nitrógeno para su crecimiento; otros organismos lo utilizan como sustrato para la respiración anaerobia, como es el caso de los desnitrificantes, que también pueden asimilar el NO_3^- ya que el primer paso de ambas reacciones es idéntico (Zumft, 1997).

La desnitrificación es el proceso por el cual se utiliza el NO_3^- como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Es realizada por microorganismos anaerobios facultativos que reducen el NO_3^- consecutivamente a NO, N_2O y finalmente a N_2 (Figura 4). Es un proceso llevado a cabo por microorganismos con una amplia diversidad bioquímica y taxonómica que en su mayoría corresponden a organismos heterótrofos, aunque también

pueda ser realizado por algunos autótrofos. Las enzimas nitrato reductasa (NaR), nitrito reductasa (NiR) y óxido nítrico reductasa (NOR) actúan secuencialmente en ausencia de oxígeno en la reducción del NO_3^- a N_2 (Knowles, 1982).

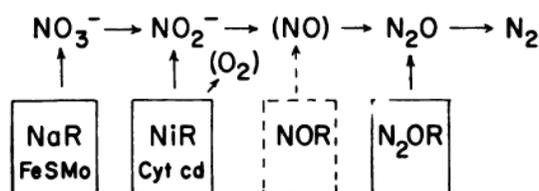


Figura 4. Modelo del transporte de electrones más probable en *Paracoccus denitrificans*,
 NaR= Nitrato reductasa; NiR= Nitrito reductasa; NOR= Óxido nítrico reductasa;
 N₂OR= Óxido nitroso reductasa; Cyt= citocromo

Tomado de Knowles (1982)

El NO_3^- producido en la rizósfera y en la interfase suelo-agua por las bacterias nitrificantes, puede difundir fácilmente al ambiente anóxico inmediato, siendo utilizado por los organismos desnitrificantes que allí se encuentran. Estos organismos también producen N_2O cuando la cadena reductora queda trunca y no se completa hasta N_2 , siendo el N_2O liberado a la atmósfera, ocasionando pérdidas de nitrógeno disponible para el cultivo además de contribuir al calentamiento global (Fiencke et al., 2005). La desnitrificación también juega un rol importante en el ciclo del N, ya que se tienen indicios de que en algunos casos, como en ambientes con deficiencia de N, los suelos pueden actuar como amortiguadores de la emisión N_2O al continuar la cadena reductora hacia N_2 (Goosens et al., 2001).

Aunque los microorganismos responsables de la actividad nitrificante no hayan sido ampliamente estudiados hasta el momento, se ha comunicado que tanto la diversidad como la cantidad de estos organismos varía en un suelo al modificar las condiciones ambientales, sobre todo en lo que respecta a la inundación y a cambios en el potencial redox (Goosens et al., 2001; Yoshida et al., 2009).

El cultivo de arroz y las emisiones de GEI

El cultivo de arroz es una de las principales fuentes de emisión antropogénica de CH_4 y una importante fuente de emisión de N_2O . El IPCC (1996) ha estimado que las emisiones de metano de campos de arroz inundados son responsables por entre 5 y 30% de las emisiones totales de dicho gas en el mundo. La cantidad de N_2O emitida en arrozales es mucho menor que la de CH_4 , dado que en suelos anegados el N_2O continúa la desnitrificación hasta N_2 , y por el contrario, la emisión de CH_4 es alta en esas condiciones (Tarlera et al., 2009).

Las emisiones de CH_4 y N_2O en el suelo de arroz dependen de condiciones ambientales generalmente opuestas. Mientras el N_2O es mayormente emitido durante el comienzo de la inundación y en etapas de riego previas a ésta, los picos de emisión de CH_4 se observan luego de un período de inundación prolongado, cuando el suelo es lo suficientemente reductor, siendo el potencial redox inferior a los -150mV (Tarlera et al., 2009; Pereira, 2009). La etapa de inundación del suelo, la cual es clave en la productividad de este cultivo, favorece la producción de CH_4 por proveer las condiciones anaerobias necesarias para la proliferación y actividad de organismos metanogénicos. Por otro lado, la emisión de N_2O ocurre en condiciones óxicas o levemente anóxicas, y uno de los factores que la determina en los cultivos de arroz es el régimen hídrico (Xing et al., 2009; Towprayoon et al., 2005), el cual también tiene repercusiones aún cuando el cultivo de arroz no esté presente, es decir, durante la etapa de rotación con otro cultivo o con pasturas (Liu et al., 2010).

La cantidad de CH_4 producida en campos de arroz es afectada por diversos factores que incluyen: el potencial redox, la disponibilidad de sustrato orgánico, y la tasa de crecimiento del cultivo. Todos estos factores son a su vez dependientes de las propiedades fisicoquímicas del suelo, del cultivar de arroz sembrado y del manejo del cultivo (tanto la fertilización como el régimen hídrico). En los arrozales, el más determinante de ellos es el potencial redox, ya que cuando se inunda un campo de arroz, el agua va desplazando al aire de los poros del suelo y la concentración de oxígeno disminuye, aumentando el poder

reductor del suelo, momento en que se produce la metanogénesis. Por ser un proceso biológico, otro factor que afecta la producción de metano en campos de arroz es la temperatura. A mayor temperatura, mayor actividad biológica dentro de los límites mesófilos y mayor producción de CH₄. Se ha comprobado que existe una relación lineal entre las emisiones estacionales de CH₄ y la temperatura atmosférica, por lo que se esperan mayores emisiones en verano, durante los últimos meses de inundación del cultivo. (Watanabe et al., 2005; Baethgen & Martino, 2000; Conrad, 1996).

Aunque los niveles de emisión de N₂O tienden a ser menores que los de CH₄ en cultivos de arroz inundados, resulta de suma importancia el estudio de las emisiones de este gas por su significativo aporte al cambio climático (Tarlera et al., 2009). El cultivo de arroz por su peculiar plantación bajo régimen de inundación, genera alternancias de suelo anegado a suelo aireado, lo que potencia las emisiones de N₂O. Ha sido reportado que las emisiones de N₂O estarían relacionadas a las raíces del cultivo cuando el suelo se encuentra inundado, mientras que se emitiría desde la superficie edáfica en condiciones de seco (Xing et al., 2009). Además, ha sido reportado que ocurre un incremento considerable en las emisiones de N₂O si se intercala una etapa de drenaje durante el período de inundación del cultivo, en comparación con el régimen de inundación continua, sobre todo en los casos en que se aplican fertilizantes nitrogenados (Liu et al., 2010; Mosier, 1998).

Los suelos inundados cultivados con arroz son considerados uno de los principales hábitats de las bacterias oxidadoras de amonio (Nicolaisen et al., 2004) y se ha observado que la estructura de la población de dichas bacterias es sensible al uso del suelo, por ello distintas prácticas agrícolas pueden repercutir en la emisión de N₂O causada por estos microorganismos (Patra et al., 2006). Recientemente, se ha descubierto que la oxidación del amonio también puede ser efectuada por arqueas del phylum *Crenarchaeota* (Leininger et al., 2006); la importancia relativa de AOA (arqueobacterias oxidadoras de amonio) y AOB (eubacterias oxidadoras de amonio) en la primera etapa de la nitrificación en los arrozales sigue en discusión (Chen et al., 2008; Glasser et al., 2010), ya que algunos autores plantean que las arqueas serían dominantes en las comunidades microbianas oxidadoras de amonio a nivel cuantitativo (Leininger et al., 2006), mientras que otros han planteado que si

bien las AOA son relativamente más abundantes que las AOB, éstas últimas serían las determinantes a nivel funcional dentro de la comunidad de microorganismos, siendo más estables sus poblaciones frente a cambios ambientales, a pesar de que ambos grupos de microorganismos coexistan (Jia & Conrad,2009; Glasser et al., 2010).

Producción de arroz y emisiones de GEI en Uruguay

En forma conjunta, el CH₄ y el N₂O son responsables por casi el 90% del potencial de calentamiento global generado en nuestro país, y se estima que el 91% de las emisiones de CH₄, y el 99% de las de N₂O provienen del sector agropecuario. En particular, las emisiones de CH₄ provenientes del sector agropecuario se deben en su mayoría a la fermentación entérica del ganado (95%), siendo el cultivo de arroz responsable de entre el 4 al 10% de las emisiones de este gas. En el caso del N₂O, la actividad pecuaria es responsable de cerca del 65% de las emisiones (Baethgen & Martino, 2000).

Uruguay es uno de los mayores exportadores de arroz del mundo, cerca del 90% de su producción es destinada a la exportación, y ocupa actualmente el séptimo lugar en el ranking mundial siendo el principal exportador de América Latina. Dicha producción es efectuada en 1% del territorio nacional y se caracteriza por ser un cultivo de baja intensidad y de semillas de alta calidad, representando actualmente 13% del valor de la producción bruta agropecuaria (INIA, 2008). Dos de las variedades más plantadas en el país son “El Paso 144” e “INIA Tacuarí”, ambas variedades fueron desarrolladas localmente y fueron sustituyendo a partir de los años 90 a las variedades extranjeras que eran introducidas al país. “El Paso 144” es una variedad índica que fue desarrollada por el CIABB (Centro de Investigaciones Agrícolas “Alberto Boerger”) en 1986, es actualmente la más plantada del país con el 68% del área total. Es una variedad de alto rendimiento, de ciclo largo con un período vegetativo extenso, con plantas bajas de alto macollaje y susceptibilidad al frío en etapas reproductivas por lo que se debe sembrar temprano. “INIA Tacuarí”, es una variedad japónica precoz, con plantas bajas con alto potencial de rendimiento en un amplio rango de fechas de siembra, debido a su buena tolerancia a bajas temperaturas en la etapa reproductiva. Por ser de ciclo corto posee un menor período vegetativo que “El Paso 144” por lo que se espera un menor desarrollo de raíces (Olmos, 2007). “INIA Tacuarí” fue la

primer variedad local de tipo “americana” de alto rendimiento desarrollada en 1992 por el INIA, se utiliza en el 15% del área total (ACA, 2012).

En nuestro país, durante los cinco meses que el arroz se encuentra plantado, el suelo permanece inundado entre el 55 y 70% del tiempo. Durante el resto del tiempo las condiciones son de secano con eventuales baños o riegos rápidos, antes de establecer la inundación definitiva. Alrededor de 20 días antes de la cosecha, se establece un drenaje final (Tarlera et al., 2009).

En nuestro país existen antecedentes de estudios centrados en la dinámica de las emisiones de N_2O y su relación con las prácticas agronómicas, pero su relación con las comunidades microbianas responsables de dichas emisiones permanece prácticamente inexplorada. Fernández et al., (2010) analizaron distintas poblaciones bacterianas en la interfase aire/agua de arrozales inundados, incluyendo a las bacterias desnitrificantes, responsables, en parte, de la emisión de N_2O . Un dato relevante de ese trabajo es que estableció que la estructura de las poblaciones de microorganismos desnitrificantes varía significativamente entre la inundación y la cosecha.

Impacto de prácticas agrícolas sobre las emisiones de N_2O

La temperatura, las propiedades fisicoquímicas del suelo y las prácticas agrícolas tales como el manejo de la irrigación y la fertilización nitrogenada, han sido identificadas como los principales factores que afectan las emisiones de N_2O en las plantaciones de arroz (Li et al., 2011). Ha sido reportado que las emisiones de N_2O ocurren durante el período de secano del cultivo del arroz, y dependen en mayor parte de los días efectivos en los que el suelo permanece seco que de la frecuencia de retiro del agua.

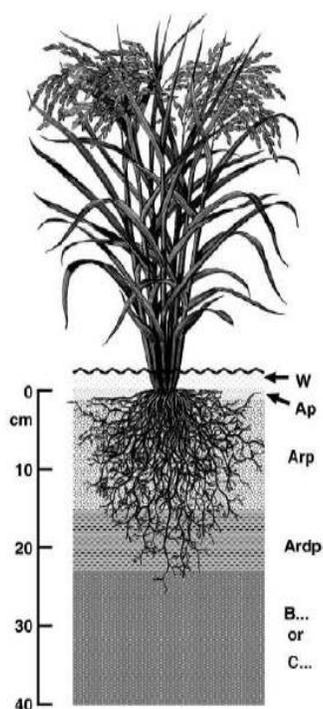


Figura 5. Corte longitudinal del crecimiento de una planta de arroz en el suelo

W: Agua que es hábitat de bacterias, fitoplancton, macrófitas y microfauna;

Ap: zona óxica o parcialmente óxica, cuyo espesor puede variar desde mm después de la inundación hasta varios cm cuando la planta crece y libera oxígeno por las raíces;

Arp: parte superior de la zona anóxica caracterizada por la ausencia de oxígeno libre en la solución del suelo con un espesor de unos 15 cm;

Ardp: Suela de arada

Tomado de Irisarri (2010)

Es por ello que se ha advertido del alto riesgo de emisión presentado por los arrozales en períodos de secano y de la importancia de controlar el régimen de irrigación empleado (Xing et al., 2009; Towprayoon et al., 2005).

Aunque el proceso de nitrificación ocurra principalmente en condiciones aerobias durante los períodos de secano, también puede ocurrir durante la etapa de inundación en la interfase suelo-agua y en el ambiente aerobio que rodea las raíces, dónde los microorganismos nitrificantes tienen acceso limitado al oxígeno (Figura 5).

Muchas de las prácticas de manejo de suelos comúnmente utilizadas en la agricultura contribuyen a las emisiones de N_2O . Por ejemplo, la aplicación de fertilizantes orgánicos y sintéticos incrementa la disponibilidad de nitrógeno en el suelo y se ha demostrado el aumento de las emisiones de N_2O en sistemas fertilizados con productos nitrogenados, acentuándose este efecto cuando el suelo es inundado. Ha sido propuesto que esto último se debe a la actividad de bacterias desnitrificantes presentes en el perfil del suelo en condiciones anaerobias, mientras que las bacterias nitrificantes serían las causantes de la emisiones durante los períodos de secano dada la condición aeróbica (Mosier et al., 1998; Zou et al., 2005; Hou et al, 2000; Towprayoon et al., 2005).

Como dato significativo, el inventario en nuestro país reveló que las pérdidas totales de N como óxido nitroso (21400 ton N/año) son muy similares a la cantidad total de N que el país importa y utiliza en los fertilizantes (Baethgen & Martino, 2000). Actualmente se recomienda el uso de 45-75kg/ha de N como fertilizante, siendo ésta una cantidad relativamente baja a nivel internacional. Esto se ha logrado luego de la incorporación de las rotaciones con pasturas de leguminosas, las cuáles permiten la fijación biológica de N y por ende disminuye la necesidad de aportar fertilizante químico (ACA, 2013).

Las prácticas agronómicas como el laboreo, la irrigación, y la incorporación de residuos de pasturas con leguminosas, también afectan los flujos de gases desde y hacia el suelo. Sin embargo, los resultados de investigación aún no permiten la consideración de dichas prácticas de manejo en la elaboración de inventarios de GEI (Baethgen & Martino, 2000). Los estudios realizados por Pereira (2009) en nuestro país fueron consistentes con

los resultados obtenidos en otras regiones. En ellos se estipula que el manejo hídrico del arroz es el principal determinante de la dinámica de las emisiones de CH₄ y N₂O, y se confirmó además que tanto la rotación con raigrás como la fertilización nitrogenada tienen efectos positivos sobre las emisiones de estos GEI.

Estudio de comunidades de microorganismos del suelo

Los métodos disponibles para el estudio de la estructura poblacional de los microorganismos generalmente presentan sesgos y limitaciones. El estudio mediante cultivos es muy limitado debido a que se estima que aproximadamente sólo el 1% de las bacterias que habitan el suelo son cultivables en el laboratorio (Torsvik et al., 1998). Las limitaciones encontradas a la hora de estudiar la diversidad microbiana del suelo recaen básicamente sobre la metodología.

La falta de conocimiento sobre la variabilidad temporal y espacial de los microorganismos determina que para contemplar la mayor heterogeneidad tanto temporal como espacial se tenga que realizar una cantidad suficiente de réplicas de cada muestreo. La incapacidad de cultivar la mayoría de ellos determina que se realicen estudios a nivel molecular con el material genético que se pueda extraer del suelo.

Sin embargo, las técnicas moleculares tampoco están exentas de limitaciones; entre éstas limitantes se encuentran: la eficiencia en la extracción del ADN bacteriano del suelo, la cual puede ser diferente para distintos grupos bacterianos (p. ej. Gram + y Gram -); la amplificación diferencial de las copias del gen de estudio debido a una distinta afinidad de los reactivos, sobretodo en el caso de los cebadores, y debido al contenido G+C de la muestra (aquellas muestras con menores contenidos serán más fáciles de amplificar).

Los métodos moleculares de estudio de la diversidad microbiana del suelo basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés *Polymerase Chain Reaction*) implican la amplificación de copias de un gen de estudio presente en una muestra de suelo.

Existen varios análisis que permiten un acercamiento a la diversidad microbiana de una muestra a partir de una reacción de PCR tales como: el DGGE (o electroforesis en gel con gradiente desnaturizante), que detecta variantes de un gen presente en muestras de ADN; el análisis de micro satélites; estudios en ARN ribosomal; o la técnica de T-RFLP (del inglés *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) dónde se somete el ADN

amplificado a una digestión con una o varias enzimas de restricción y se detectan los fragmentos terminales generados (Kirk et al., 2004).

El T-RFLP es un método basado en la amplificación por PCR de un gen marcador, donde uno de los cebadores posee un fluoróforo en su extremo terminal 5'. Los productos de la reacción son luego digeridos con una o varias enzima(s) de restricción, y los fragmentos resultantes son separados en un secuenciador automático que detecta el largo de los fragmentos terminales marcados. Se obtiene un perfil de diferentes tamaños de fragmentos de restricción llamado electroferograma, el cual permite estimar la riqueza de una población microbiana. Los picos del electroferograma definen las unidades taxonómicas operacionales (OTU; del inglés *Operational Taxonomic Unit*) y el área debajo de los mismos representa la abundancia relativa de cada una. Esta herramienta ha sido ampliamente utilizada para estudiar las comunidades microbianas y los efectos que distintas prácticas de manejo de suelo tienen sobre éstas (Osborn et al., 2000).

Las bacterias oxidadoras de amonio son consideradas un modelo de estudio para la ecología microbiana, ya que constituyen un grupo relativamente pequeño y detectable en ambientes muy diversos (Kowalchuk et al., 2001). Algunos de estos organismos han demostrado ser cultivables en laboratorio pero no es el caso de la mayoría debido al lento crecimiento que poseen. Es por eso que se han llevado a cabo análisis moleculares, tanto con el gen de la subunidad ribosomal 16S (16S rARN) como con el gen *amoA*. Los estudios con el gen *amoA* mostraron resultados filogenéticos muy similares a los obtenidos con el 16S rARN. Se ha observado que existen diferentes ecotipos funcionales de estos organismos en distintos ambientes, y se ha visto que determinados cambios ambientales tienen impacto sobre su estructura poblacional, lo que sugiere que podrían constituir un buen grupo de organismos indicadores de polución y deterioro ambiental, así como de recuperación de ecosistemas. Estos organismos han sido utilizados a nivel biotecnológico en procesos de biorremediación, y para demostrar su utilidad se promueve la realización de prácticas rápidas y precisas que permitan la detección de variaciones ecológicas. Una de ellas, es la técnica de T-RFLP a partir de fragmentos previamente amplificados por PCR del gen *amoA* (Kowalchuk et al., 2001).

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar el impacto de algunas prácticas de manejo del cultivo de arroz sobre la estructura de las poblaciones de arqueas oxidadoras de amonio del suelo.

Objetivos específicos:

- Determinar los efectos de **dos cultivares** de arroz sobre la estructura de las poblaciones de arqueas oxidadoras de amonio.
- Determinar el efecto del **manejo del agua** durante el cultivo de arroz sobre la estructura de las poblaciones de arqueas oxidadoras de amonio.
- Determinar si existen diferencias en la estructura de las poblaciones de arqueas oxidadoras de amonio entre las diferentes **estadios de crecimiento del cultivo de arroz**.
- **Identificar** las arqueas oxidadoras de amonio más sensibles a los cambios en el manejo del cultivo de arroz

Hipótesis

Ha sido demostrada la estrecha relación que existe entre los vegetales y los microorganismos que habitan el suelo en el que se desarrollan, y se ha observado que las prácticas de manejo agrícola también tienen repercusiones sobre el crecimiento de la microbiota del suelo. Al modificarse las condiciones del suelo, se modificará el desarrollo de las comunidades microbianas. En particular, las arqueas oxidadoras de amonio han demostrado ser abundantes en diferentes tipos de ambientes, adaptándose a una gran variedad de condiciones de crecimiento.

La hipótesis de este trabajo es que la estructura poblacional de las arqueas oxidadoras de amonio del suelo responderá a las modificaciones experimentales realizadas en el cultivo de arroz.

Predicciones

- La estructura poblacional de las arqueas oxidadoras de amonio presentará variaciones entre un cultivo drenado y un cultivo no drenado. La diversidad será mayor en el cultivo drenado por proveer mayor disponibilidad de O₂ a las poblaciones nitrificantes.
- La estructura poblacional de las arqueas oxidadoras de amonio presentará variaciones entre un cultivo de la variedad indica “El Paso 144” y la variedad japónica “INIA Tacuarí”. La diversidad será mayor en la variedad “El Paso 144” por poseer un ciclo vegetativo más largo, el cual podría proveer mayor espacio rizoférico a la comunidad nitrificante.
- La estructura poblacional de las arqueas oxidadoras de amonio presentará variaciones según el estadio en que se encuentre el cultivo. La diversidad será mayor en etapas previas a la inundación e irá decreciendo hasta el momento de la cosecha, debido a que la inundación limita la cantidad de O₂ disponible para la comunidad nitrificante.

Materiales y Métodos

Características fisicoquímicas del suelo

El suelo utilizado en los ensayos del presente estudio proviene de la unidad experimental “Paso de la Laguna”, perteneciente al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (33°16'10.00" S; 54°10'04.00" W), localizada en departamento de Treinta y Tres. El tipo de suelo colectado es un Argiudol típico (Tabla 1) y fue colectado 2 meses antes de la instalación del ensayo.

Tabla 1. Principales propiedades fisicoquímicas del suelo utilizado en el presente estudio, determinadas al comienzo del experimento.

pH		%MO	µg/g		meq/100g de suelo			
H ₂ O	KCl		N-NO ₃	P(Bray I)	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺
5,7	4,6	3,4	10	13	5,4	3,3	0,42	0,83

Diseño experimental en invernáculo

El ensayo se realizó en el invernáculo de la Facultad de Agronomía (UdelaR), durante un ciclo de cultivo completo. El suelo fue tamizado y repartido en 12 cajones de 40x60 cm, ubicados en un diseño aleatorio. Se colocó aproximadamente 60 kg de suelo tamizado por cajón. La densidad de siembra de las semillas de arroz fue similar a la que se encuentra en campo, aproximadamente 170 kg/ha (Nuñez, 2013), y se sembraron en dos líneas paralelas por cada caja.

El experimento realizado consistió en tres variables de estudio: el cultivar de arroz, el manejo de agua del cultivo, y la edad fisiológica de la planta. Para analizar estas variables se realizó un diseño experimental factorial de 2X2.

El primer factor de variabilidad a evaluar fue el cultivar de arroz. Con el fin de estudiar el efecto de la variedad de arroz sobre la estructura de las comunidades microbianas oxidadoras de amonio presentes en el suelo, se sembraron las variedades “INIA Tacuarí” (variedad Japónica) y “El Paso 144” (variedad Índica).

El segundo factor de variabilidad fue el régimen de agua aplicado al cultivo, en el que se

buscó evaluar el efecto del drenaje de la inundación al comienzo del estadio de floración del cultivo sobre las comunidades microbianas oxidadoras de amonio, siendo uno de los tratamientos drenados y el otro no drenado.

Los tratamientos se detallan a continuación y consistieron en 3 réplicas cada uno: Tacuarí drenado (TD), Tacuarí no drenado (TnD), El Paso drenado (EPD), y El Paso no drenado (EPnD). Se le aplicó a todos los tratamientos 100 kg de nitrato de amonio y 20 kg de urea por hectárea de suelo, al momento de la siembra y al comienzo de los estadios de macollaje y de primordio floral. Se estableció la inundación al macollaje en todos los tratamientos. En el caso de los tratamientos drenados, el retiro del agua se efectuó al comienzo del estadio de floración, y se volvieron a inundar a los 16 días. El drenaje final para todos los ensayos se realizó una semana antes de la cosecha.

Luego se retiraron las muestras en diferentes etapas del ciclo del cultivo, generándose la tercera variable de estudio que se detalla a continuación.

Muestreo de suelo

Se tomaron muestras de suelo en 4 momentos: en el macollaje (fecha A), un día después de la aparición del primordio floral (fecha B), 5 días después del retiro de la inundación en los tratamientos drenados (fecha C) y en la cosecha (fecha D). Para cada repetición, cada muestra consistió en 6 cilindros de suelo tomados al azar de 7 cm de profundidad y 1 cm de diámetro que luego se mezclaron para conformar la muestra con la que se trabajó posteriormente. Las muestras de suelo se conservaron a -20°C.

Extracción de ADN

Previamente a la extracción del ADN, las muestras de suelo se secaron en estufa a 26°C y 40% de humedad relativa durante 48 hs, y se tamizaron con una malla de 2 mm. La extracción se realizó mediante el kit comercial *PowerSoil*® *DNA Isolation Kit* (Mo Bio Laboratories, Inc., EEUU). La cantidad y calidad del ADN extraído se estimó tanto mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v) en buffer de corrida TBE 0,5X (ANEXO 2), comparando con una cantidad conocida del marcador de peso molecular 1kb plus (Fermentas, Canadá), como mediante espectrofotometría utilizando Nanodrop®

2000c UV-vis Spectrophotometry (USA) para evaluar el cociente de absorbancia A_{260}/A_{280} como indicador del grado de pureza del ADN (ANEXO 1).

Construcción de una biblioteca de ADN del gen *amoA* arqueano

El gen *amoA* de arqueas se amplificó mediante PCR, utilizando los cebadores ArchamoA-1F (STAATGGTCTGGCTTAGACG) y ArchamoA-2R (GCGGCCATCCATCTGTATGT), con un tamaño de amplicón esperado de aproximadamente 635 pb (Chen et al., 2008). Cada reacción fue realizada en un total de 25 μ L, conteniendo 2 μ L de ADN perteneciente a una muestra de la fecha de A tomada al azar. La reacción contenía Buffer para *Taq polymerase* sin $MgCl_2$ 1X; $MgCl_2$ 6 mM; dNTPs 0,2 mM; 0,5 mM de cada cebador (F y R); 0,08% (p/v) de BSA (seroalbúmina bovina); 0,625 μ L de DMSO (Dimetilsulfóxido); 0,5 unidades de *Taq polymerase* (ThermoScientific); y agua destilada estéril hasta completar el volumen final.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit comercial de purificación de PCR AxyPrep® (Axygen Biosciences, Hangzhou, China) según las instrucciones del fabricante.

Los productos de PCR y las purificaciones fueron verificadas en gel de agarosa 1.2% (p/v) en buffer de corrida TBE 0,5X. Los productos de PCR purificados fueron ligados en un vector apropiado utilizando el kit *CloneJET PCR Cloning Kit* (Fermentas, Canadá); y transformados en células electrocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 (Laboratorio de Microbiología, Facultad de Agronomía). El vector utilizado en el presente estudio fue el plásmido PJET1.2, que posee un gen que otorga al hospedero resistencia a la ampicilina.

Se colocaron 25 ng de producto de PCR en 10 μ L de Buffer de ligación y se agregó 1 μ L de *DNA Blunting enzyme* y agua destilada estéril c.s.p. 18 μ L, se incubó en baño seco a 70°C durante 5 minutos. En esta etapa la enzima *DNA Blunting enzyme* elimina los dA en los extremos de los productos de PCR, generando fragmentos con extremos romos y listos para la ligación. La mezcla se enfrió en hielo durante 30 minutos, y se le agregó a la mezcla 1 μ L de vector PJET1.2 junto con 1 μ L de enzima *T4 ligase* (Fermentas, Canadá). Finalmente, se incubó la mezcla en el baño seco a 22°C durante 5 minutos para permitir la

ligación del vector con el fragmento del gen *amoA* arqueano (ANEXO 3). La mezcla de ligación se purificó del mismo modo que los productos de PCR.

La transformación se realizó mediante la técnica de electroporación que consiste en un significativo aumento momentáneo de la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que permite la entrada del vector que contiene nuestro gen de estudio al interior de la bacteria *E. coli*. Esta técnica es una de las más eficientes para realizar una transformación, y se logra mediante la generación de un campo eléctrico con alto voltaje en el exterior de la membrana mediante un electroporador. Para ello se colocó 1 μ L de ligación purificada junto con 50 μ L de células electrocompetentes de *E.coli* en una cubeta de electroporación de 2 mm. Se aplicó un voltaje de 2.5 kV durante 5 ms en un electroporador (*Multiporator*, Eppendorf®). Se agregó 1ml de medio LB líquido, se trasvasó a un tubo de ensayo y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación moderada. Se sembraron 100 μ l del cultivo obtenido en placas con medio LB con ampicilina (50 μ g/ml) y se incubaron a 37°C durante 24hs.

De entre las colonias crecidas se seleccionaron al azar algunas de ellas para realizar minipreps. Se centrifugaron 1.5ml de cultivo a velocidad máxima (13.000 rpm) durante 1 minuto. Se le añadieron 100 μ l de solución I y se homogeneizó la mezcla mediante un agitador tipo vórtex. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se añadieron 200 μ l de solución II hecha en el momento (Anexo 7). Se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 150 μ l de solución III y se mezcló por inversión. Se incubó durante al menos 15 minutos en hielo. Se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante y se añadió 1 ml de EtOH (etanol 100% (v/v)) a temperatura ambiente. Se centrifugó inmediatamente a máxima velocidad durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 50 μ l de buffer TE con agregado de RNAsa (10 mg/ml) preparado en el momento, y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Se homogeneizó con agitador tipo vórtex y se incubó 15 minutos a 37 °C. Se añadieron 30 μ l de solución PEG (polietilenglicol) 8000 20% (p/v) con 2.5M NaCl. Se homogeneizó con un agitador tipo vórtex y se incubó en hielo durante 1 hora. Se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos y se lavó con 500 μ l de EtOH 70 %

(v/v) frío. Se secó en estufa a 37°C y se resuspendió en 30 µl de buffer TE (pH=8). Las soluciones utilizadas para realizar las minipreps se encuentran detalladas en el Anexo 7.

De entre los clones positivos se seleccionaron al azar 21 representantes para ser secuenciados. Se usaron los cebadores del plásmido PJET1.2 (Fermentas, Canadá) para realizar una reacción de PCR del plásmido con el inserto. Se realizó una mezcla de PCR de un total de 25µL para amplificar los clones, conteniendo Buffer para *Taq polymerase* sin MgCl₂ 1X; MgCl₂ 3 mM; dNTPs 0,2 mM; 0,5 µM de cada cebador (F y R); 0,16% (p/v) de BSA (seroalbúmina bovina); 0,625 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido); 0,5 unidades de *Taq polymerase* (ThermoScientific); y agua destilada estéril hasta completar el volumen final. Con un tip estéril se tocó la colonia y se introdujo la muestra dentro de la mezcla de PCR, homogeneizando. Los productos de PCR fueron verificados en gel de agarosa 1.2% (p/v) en buffer de corrida TBE 0,5X, aquellas que tuvieron el tamaño esperado de amplicón (~ 735 pb), verificadas con el marcador de peso molecular 100bp o 100 bp plus (Fermentas, Canadá), fueron purificadas con el mismo procedimiento mencionado previamente, y enviadas a Macrogen (Seúl, Corea) para su secuenciación.

Las secuencias se alinearon con el software MEGA6 y se eliminaron los fragmentos correspondientes a los cebadores del plásmido PJET 1.2. Las secuencias obtenidas se clasificaron en un árbol filogenético de tipo *Neighbour Joining* con un valor de Bootstrap de 500, mediante el software MEGA 6 (www.megasoftware.net). Para confirmar que las secuencias pertenecían al gen *amoA* arqueano, se las comparó mediante la herramienta BLAST de la base de datos NCBI. En un primer momento se realizó un BLAST empleando como base de datos la colección de nucleótidos (*Nucleotide collection*), dónde se encuentran secuencias parciales. De este modo se buscó comprobar la amplificación del gen *amoA* arqueano (ANEXO 5). Luego se realizó un segundo BLAST en relación a los organismos secuenciados de la base de datos (*Reference genomic sequences*), con el objetivo de identificar con qué microorganismos de la base de datos tienen homología las secuencias de los clones (ANEXO 6).

Con el fin de determinar cuál sería el tamaño esperado del fragmento de restricción terminal de cada secuencia, se digirieron *in silico* usando la herramienta Ncb cutter de New England Biolabs (www.neb.com). Se probaron las enzimas *AluI*, *MboI* y *HaeIII*.

T-RFLP del gen *amoA* de arqueas

La estructura de las comunidades de los microorganismos mencionados se evaluó mediante el análisis de fragmentos terminales de restricción (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*; T-RFLP).

*1) Amplificación del gen *amoA* arqueano y digestión con enzima de restricción *MboI*:*

Se amplificó el gen *amoA* de *Archaea* mediante los mismos cebadores previamente utilizados para realizar la biblioteca génica. Se utilizó el cebador ArchamoA-1F marcado con 6-carboxifluoresceína (FAM) para su posterior detección por capilares en el análisis de T-RFLP. La estrategia para amplificar el gen *amoA* arqueano fue mediante amplificación en dos rondas. En la primera ronda de PCR se utilizó el cebador ArchamoA-1F sin marcar con FAM con el mismo procedimiento que el utilizado para realizar la biblioteca génica excepto que se utilizó la enzima *DreamTaq polymerase* y su correspondiente Buffer en las mismas concentraciones (ANEXO 3).

La segunda ronda de PCR se realizó con el cebador marcado con FAM en un volumen total por tubo de 25 μ L, conteniendo 1,5 μ L de molde; Buffer para *DreamTaq polymerase* sin $MgCl_2$, 1X; 2 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de dNTPs; 0,4 mM de cada cebador (F marcado y R); 0,08% (p/v) de BSA; 0,625 μ L de DMSO puro; 0,5 unidades de *DreamTaq polymerase* (ThermoScientific); y agua destilada estéril hasta completar el volumen final; se utilizó como molde de la reacción el producto de PCR sin marcar previamente obtenido (ANEXO 3). En la segunda ronda de PCR se realizaron 4 reacciones por muestra. Se purificaron 100 μ L de producto de PCR por muestra con el mismo kit de purificación previamente utilizado. Los productos y las purificaciones fueron verificados con el mismo procedimiento mencionado que en el caso de la biblioteca génica.

Se digirieron 125 ng del producto de PCR purificado, éstos se suspendieron en 2 μ L de Buffer R; 5 unidades de enzima *MboI* (ThermoScientific, EEUU) y agua destilada estéril c.s.p. 20 μ L. Dicha mezcla se incubó primero a 37°C durante 4 horas; y luego a 80°C durante 20 minutos para inactivar la enzima (ANEXO 3). Los productos digeridos fueron enviados al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo para su análisis de T-RFLP mediante capilares.

2) Análisis de fragmentos:

Los electroferogramas obtenidos se analizaron mediante el software PeakScanner™ v1.0 (Applied Biosystems). La estructura de las comunidades se obtuvo calculando la cantidad y el área de los picos obtenidos. La cantidad de picos determina la cantidad de unidades taxonómicas operacionales (OTUs del inglés *Operational Taxonomic Unit*) diferentes encontradas en cada muestra (riqueza), mientras que el área de cada pico representa la abundancia relativa de cada OTU. La abundancia relativa de cada fragmento terminal de restricción (T-RF) se calculó como el porcentaje del área del pico con respecto al área total del perfil de T-RFLP al cual pertenece. Sólo se consideraron aquellos picos con un área relativa superior al 1%. Se generó una matriz de datos con los valores obtenidos (ANEXO 4). Los resultados obtenidos permitieron el cálculo de los índices de diversidad de Shannon (H') y equitatividad de Pielou (J) (Shannon y Weaver, 1949; Pielou, 1977).

$$H' = -\sum P_i \cdot \ln(P_i); J = H' / \ln(S)$$

Pi: proporción de individuos de la OTU con respecto al total

S: riqueza, total de OTUs

Análisis estadístico

Los índices de diversidad y equitatividad calculados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA; Test de Tukey, $p < 0.05$), con el objetivo de identificar si las diferencias entre las variables eran estadísticamente significativas.

Los datos obtenidos de los perfiles de T-RFLP se analizaron mediante PCA (análisis de los componentes principales), usando el software libre PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>; Hammer et al., 2001).

El PCA genera un ordenamiento de los datos que permite su representación en un espacio bidimensional. Esto se realizó en un primer momento con la totalidad de los resultados y luego segregando por variable a estudiar. Mediante el análisis de la composición de los componente principales se identificaron los T-RFs responsables de las diferencias observadas entre los tratamientos (Wolsing y Priemé, 2004).

Se representó la similitud entre las comunidades presentes mediante la herramienta de “Clustering” multivariado del mismo programa, utilizando el índice de Bray-Curtis y un Bootstrap de 10,000.

Resultados

Extracción de ADN

El ADN del suelo de los respectivos muestreos fue exitosamente extraído mediante el kit comercial *Power Soil, DNA isolation kit* (MoBIO Laboratories, Inc., EEUU), obteniéndose un alto grado de pureza, determinado mediante el cociente A_{260}/A_{280} (ANEXO 1). La integridad del ADN purificado se confirmó mediante corridas electroforéticas (Figura 6). La concentración de ADN se estimó también comparando con una cantidad conocida del marcador de peso molecular 1kb plus (Fermentas, Canadá).

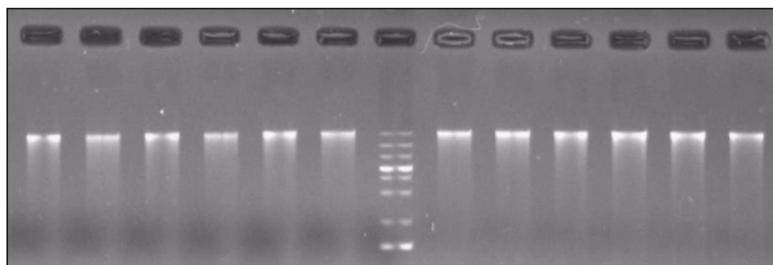


Figura 6. Corrida electroforética de extracciones de ADN del suelo en buffer TBE 0,5X gel de agarosa 0,8% correspondiente a dos sets de muestras (TD y ED), con sus respectivas 6 repeticiones en el siguiente orden de los carriles: T1D, T2D, T3D, T5D, T7D, T8D, Marcador 1kbplus, E1D, E2D, E3D, E4D, E5D, E7D

Construcción y análisis de una biblioteca de ADN del gen *amoA* arqueano

La construcción de bibliotecas de ADN de los genes estudiados cumplió tres cometidos. Por un lado, se buscó comprobar la especificidad los cebadores elegidos. Por otro lado, las secuencias obtenidas de los clones permitieron realizar digestiones *in silico* y hacer una preselección de enzimas de restricción para realizar el análisis de T-RFLP. Finalmente se pueden relacionar las secuencias obtenidas y sus afiliaciones filogenéticas con algunos T-RFs al comparar posteriormente con los datos de los T-RFLP.

Los 21 clones secuenciados exhibieron altos grados de homología (mayor al 90%) con respecto a las secuencias parciales de arqueas oxidadoras de amonio depositadas en la base de datos de NCBI (colección de nucleótidos de GenBank), pertenecientes a dos *phyla*

de organismos no cultivados: *Crenarqueota* y *Thaumarchaeota*. Por otro lado, al contrastar las secuencias obtenidas en el presente estudio con las obtenidas a partir del genoma completo de microorganismos, que se encuentran en la base de datos de Referencias Genómicas del GenBank, las secuencias del presente estudio tuvieron altos grados de homología con las de tres especies de arqueas oxidadoras de amonio: *Nitrososphaera gargensis*, *Nitrosoarchaeum limnia*, y *Nitrosopumilus maritimus* (Figura 7).

Al realizar la digestión *in silico* de los clones, se determinó que la enzima *AluI* segrega los 21 clones en 4 grupos, la enzima *MboI* en 6 grupos, mientras que *HaeIII* los separa solamente en 2 grupos. Tanto la enzima *AluI* como *MboI* demostraron ser apropiadas para generar perfiles de restricción informativos, a diferencia de *HaeIII* cuyos fragmentos generados serían insuficientes para diferenciar las muestras (Tabla 2; Figura 7). Se eligió finalmente la enzima *MboI* para realizar el análisis de T-RFLP del gen *amoA* arqueano.

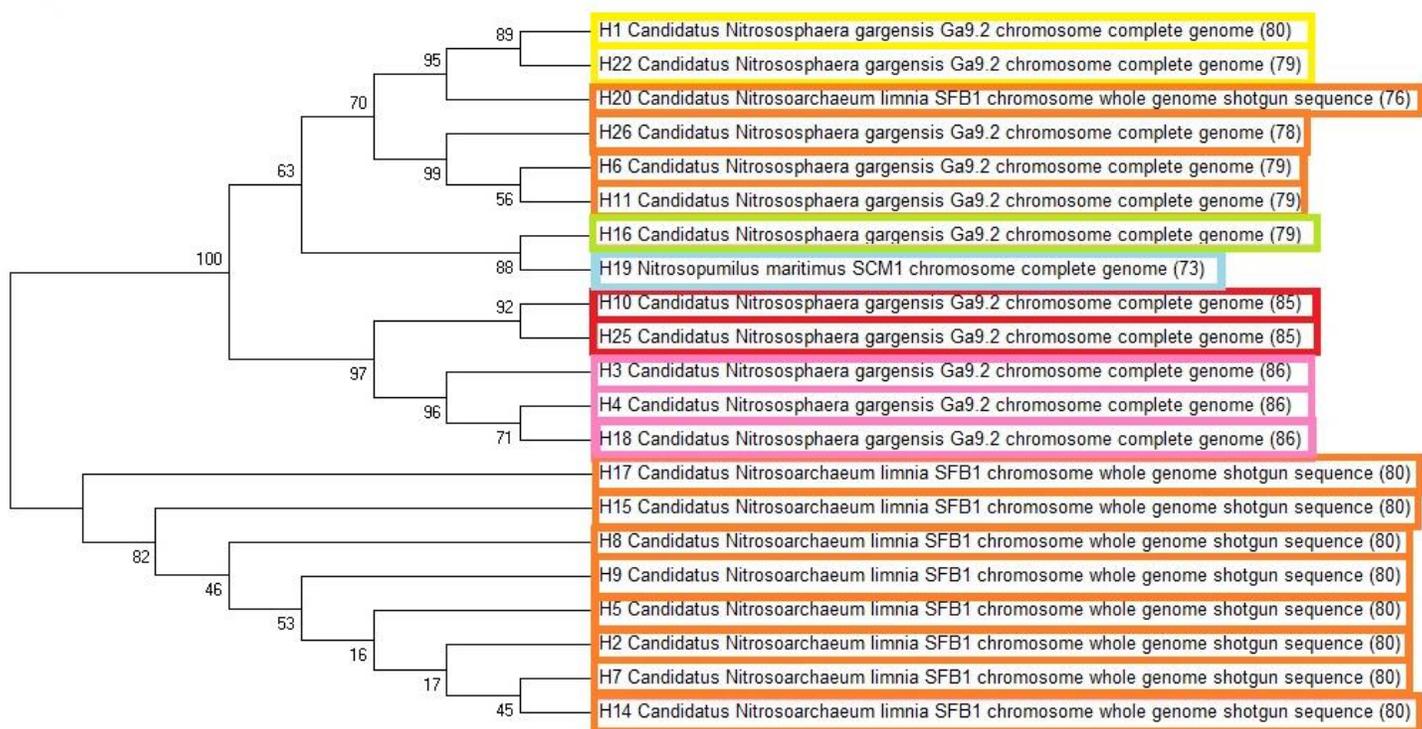


Figura 7. Árbol filogenético generado mediante *Neighbour Joining* de los 21 clones pertenecientes a la biblioteca génica. Los colores representan los diferentes T-RFs que hubiésemos obtenido al digerir con la enzima de restricción *MboI* (ver Tabla 2). Al lado del nombre del clon se indica el organismo con cuyo gen *amoA* exhibió mayor similitud. Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de similitud.

Tabla 2. Tamaños de los fragmentos de ADN terminales (desde el primer F) generados mediante digestiones *in silico* de los 21 productos de PCR clonados en la biblioteca génica, con las enzimas de restricción *MboI*, *AluI* y *HaeIII*.

pb: indica la longitud del fragmento terminal en pares de bases

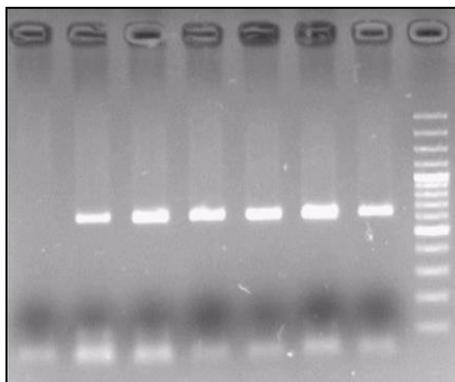
MboI		AluI		HaeIII	
Clones	pb	Clones	pb	Clones	pb
H2, H5, H6, H7, H8, H9, H11, H14, H15, H17, H20, H26	187	H3, H4, H17, H18, H20	32	Todos menos H2	4
H19	209	H10, H16, H19, H25	76	H2	No corta
H1, H22	301	H2, H5, H7, H8, H9, H14, H15	348		
H10, H25	323	H1, H6, H11, H22, H26	No corta		
H3, H4, H18	494				
H16	No corta				

T-RFLP del gen *amoA* de arqueas

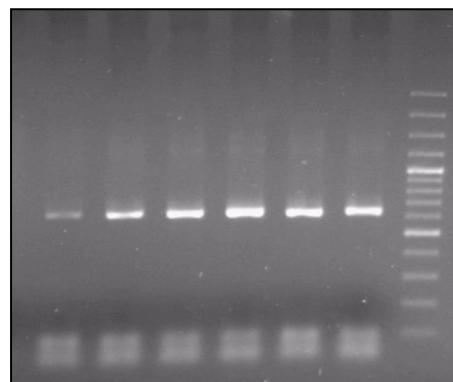
1) Amplificación del gen *amoA* arqueano y digestión con enzima de restricción *MboI*:

Se obtuvieron productos de PCR correctamente purificados y aptos para digerir con la enzima de restricción *MboI*.

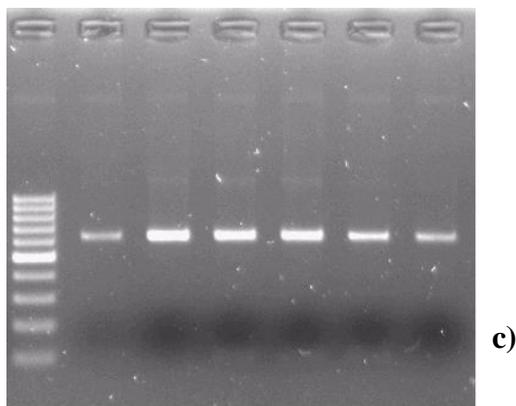
En la Figura 8 se observan ejemplos de corridas electroforéticas realizadas con los productos de PCR de primera y segunda ronda y su posterior purificación. En todos los casos se obtuvieron productos del tamaño esperado para el gen *amoA* arqueano (~635 pb).



a)



b)



c)

Figura 8. Corridos electroforéticos de los productos de pcr (a) PCR de primera ronda; (b) PCR de segunda ronda; (c) productos de segunda ronda purificados; con el siguiente orden de carriles para las imágenes (a) y (b): Control Negativo, T1D, T2D, T3D, T5D, T7D, T8D, Marcador 100bp plus. La imagen (c) posee el marcador 100 bp en el primer carril y no se realizó control negativo. El orden de las muestras es el mismo que el previamente enumerado para las imágenes (a) y (b)

2) Análisis de fragmentos

Mediante Peakscanner (Figura 9) se eliminaron del análisis aquellas OTUs que tenían un área relativa menor a 1% y luego se procedió al análisis de los valores relevados. Se encontraron un total de 28 OTUs.

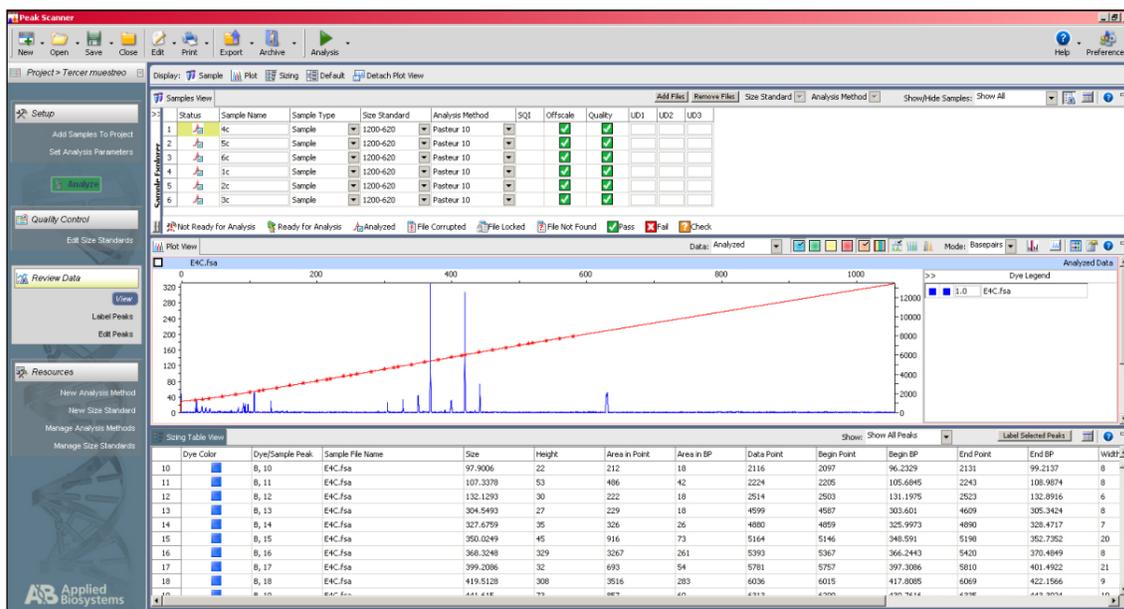


Figura 9. Imagen de la pantalla principal del software *Peakscanner* donde se observa un electroferograma y la lista de los valores correspondientes a cada pico detectado por los capilares

La riqueza y los índices de diversidad calculados a partir de la matriz de datos, (ANEXO 4) permiten una primera aproximación al análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio. Se obtuvieron diferencias significativas tanto entre los cultivares como entre las fechas de muestreo ($p < 0.05$; Tukey HSD Test). El riego no presentó diferencias significativas entre los valores de diversidad, por lo que no se tuvo en cuenta en la construcción de gráficas comparativas de los índices de diversidad (Figura 11 y 12). Las poblaciones de arqueas oxidadoras de amonio en el cultivar “INIA Tacuarí” resultaron menos diversas y menos equitativas que las del cultivar “El Paso 144”, sobre todo durante la fecha A (Figura 10).

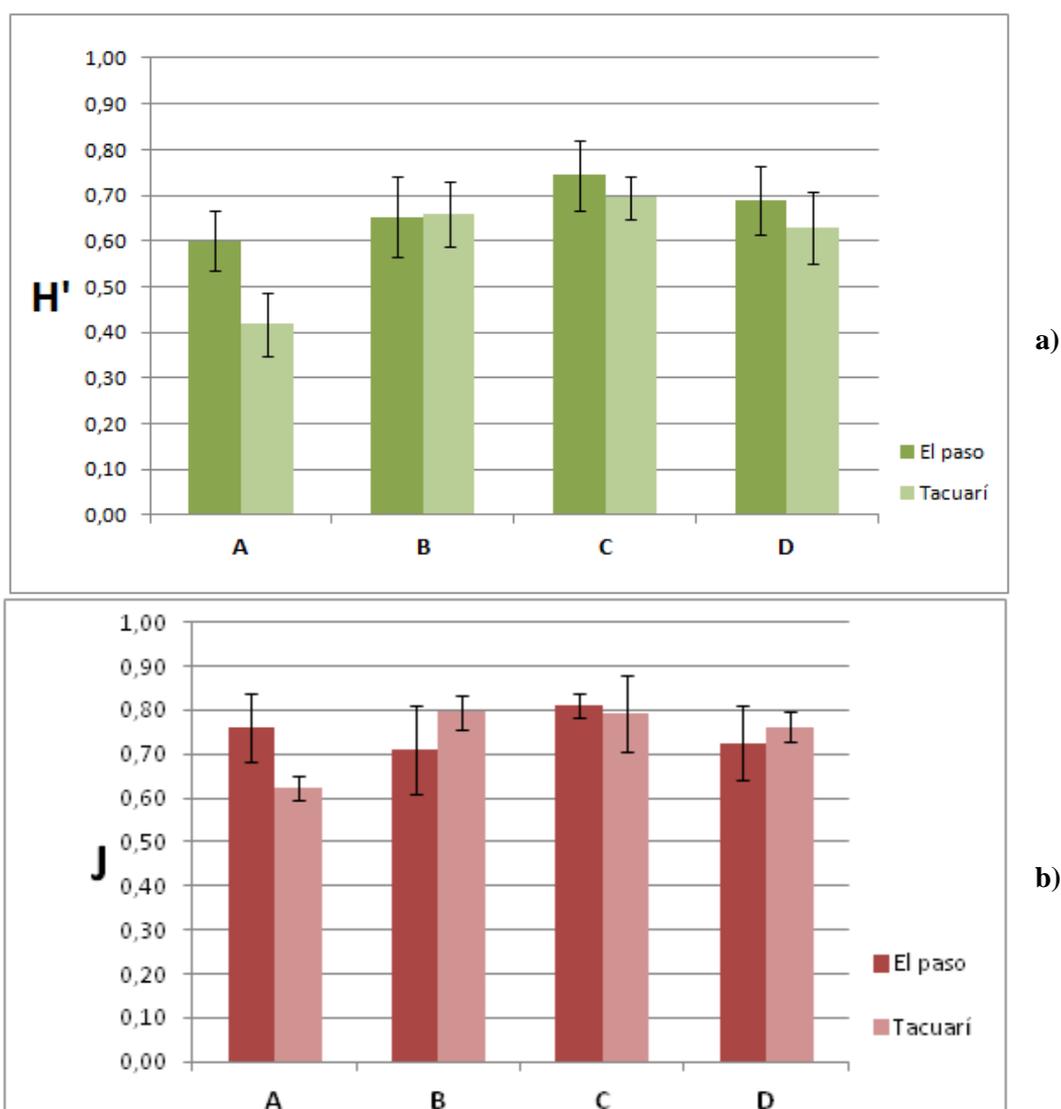


Figura 10. Promedios y desvíos estándar correspondientes a, (a) los índices de Diversidad de Shannon-Wiener (H'); (b) Equitatividad de Pielou (J), para cada muestra analizada en las fechas de muestreo: A (macollaje), B (primordio floral), C (luego del drenado) y D (cosecha).

En las 48 muestras analizadas se encontraron 18 OTUs ocasionales (aquellas que aparecen entre 1 y 3 veces); nombradas según el tamaño del fragmento terminal estas OTUs fueron: 143, 210, 229, 232, 263, 267, 289, 316, 319, 326, 345, 414, 434, 571, 581, 610, 621 y 630. Además, se detectaron OTUs recurrentes en todas las muestras: 133, 305, 328, 350, 368, 390, 398, 420, 442 y 633(ANEXO 4).

En todos los casos, entre el 60% y el 100% del área relativa, se debió a la abundancia de tres OTUs: 368, 420 y 633. Estas OTUs fueron claramente las mayoritarias en todos los tratamientos y fueron las más abundantes en las muestras, superando en algunos casos el 50% de la abundancia relativa de una muestra como es el caso de la OTU 420 en 4 muestras de la fecha A, en una muestra de las fechas C y D; y en el caso de 633 en una ocasión en la fecha B. Es interesante destacar además que existen OTUs que no aparecen en determinadas fechas de muestreo y son abundantes en otras como 350, 398 y 442. Ninguna de las tres fue registrada ni en la fecha A, ni en los muestreos correspondientes a las fechas C y D para el cultivar “INIA Tacuarí”. La OTU 350 estuvo presente en el análisis de El Paso en la fecha C, no para Tacuarí. Significativamente, la OTU 434 fue registrada solamente en el cultivar “El Paso 144” durante la cosecha (fecha D) (ANEXO 4).

En las figuras 11 y 12 se observa la distribución de los datos obtenidos a partir de los promedios de las áreas relativas de cada OTU. La figura 11 muestra las gráficas según la variable a tratar, (ya sea el cultivar, el riego o la fecha de muestreo), donde se ve en qué proporción se distribuyó cada OTU. La figura 12 muestra el aporte relativo de cada OTU al perfil de restricción de los diferentes tratamientos. En ambos casos no se tuvieron en cuenta las OTUs ocasionales.

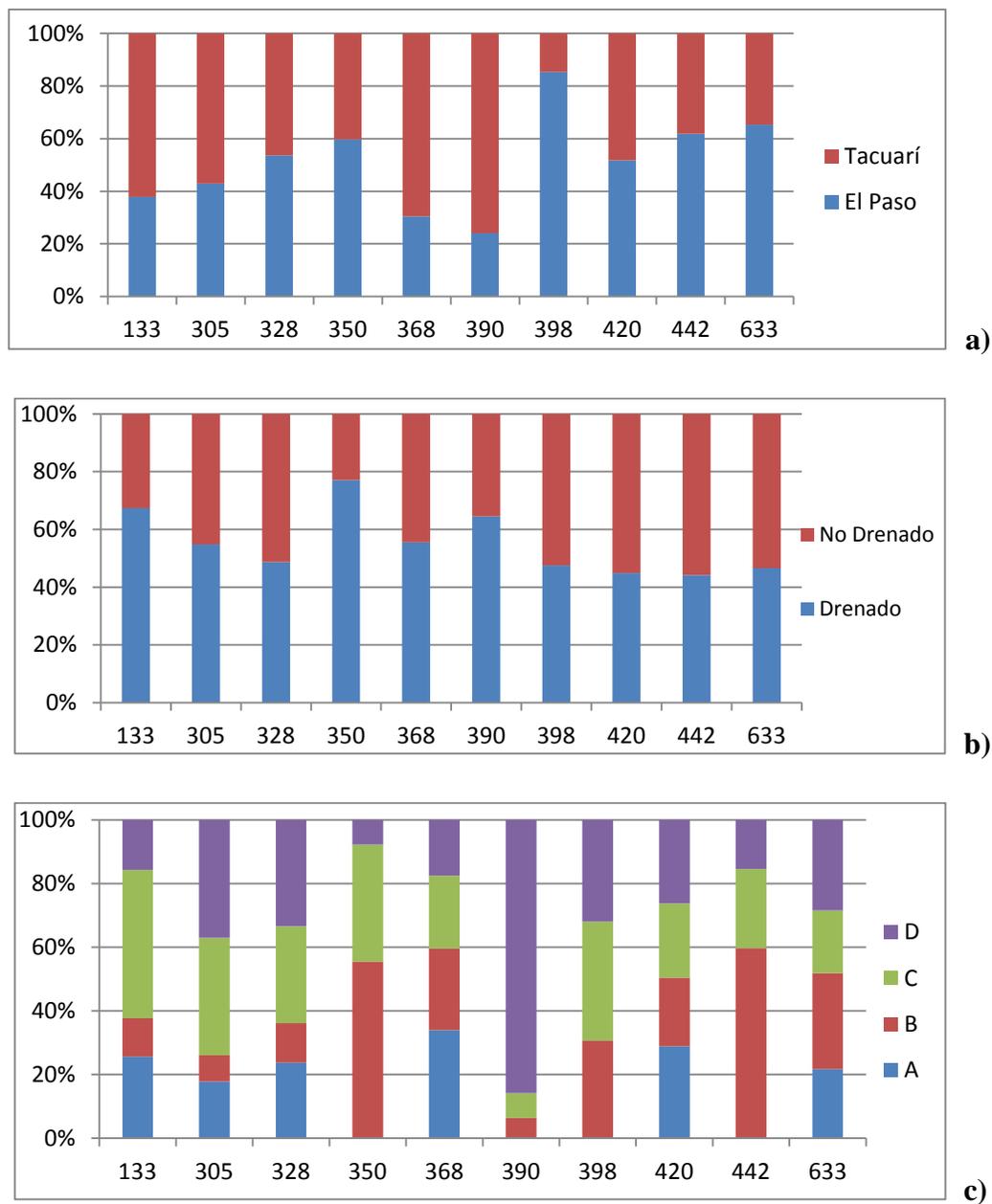


Figura 11. Proporción relativa de cada OTU, realizada a partir de los promedios, según el tratamiento: (a) el cultivar, (b) riego y (c) la fecha de retiro de la muestra: A (macollaje), B (primordio floral), C (luego del drenado) y D (cosecha).

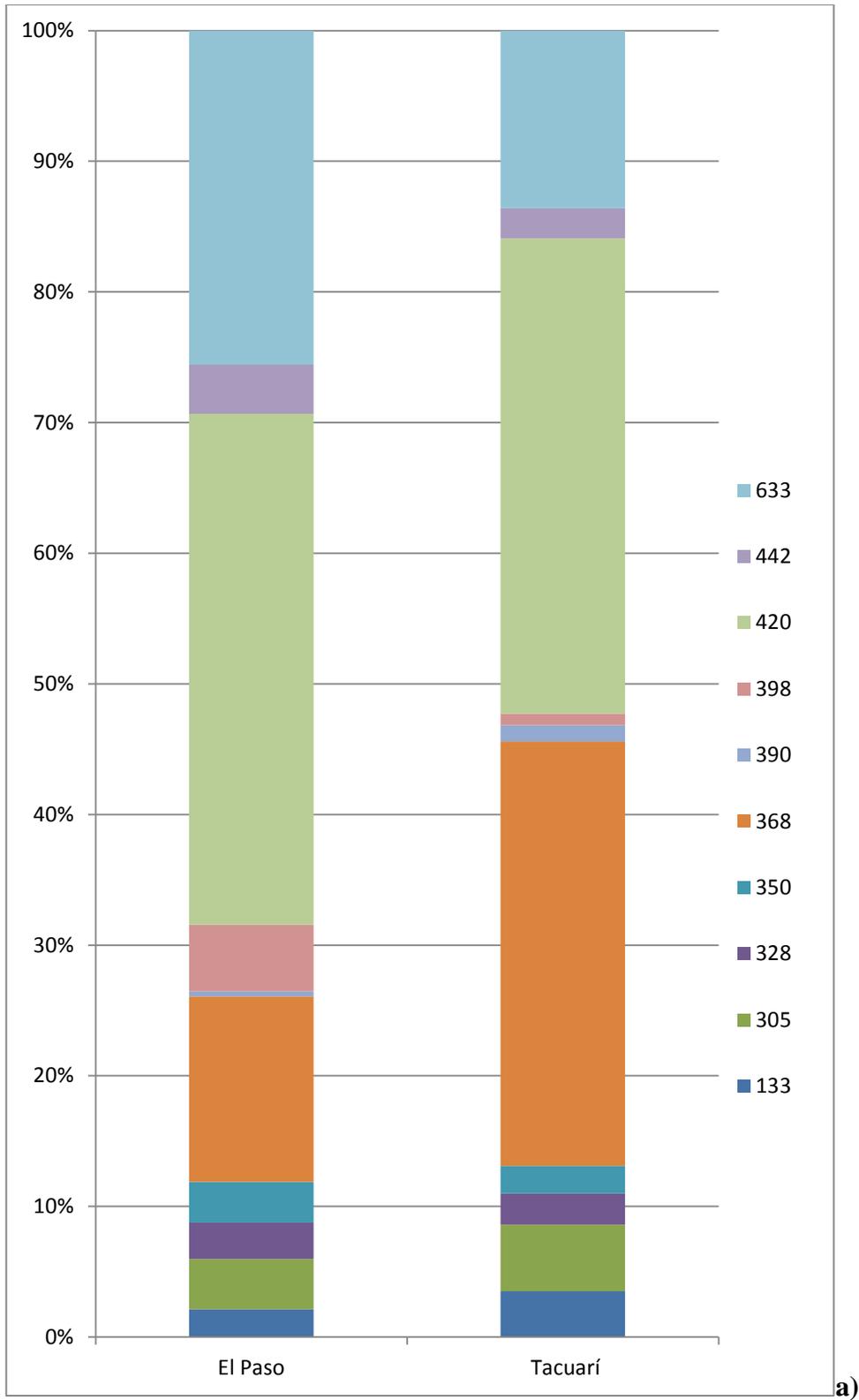
En la figura 11 se observa que para las tres variables estudiadas existen OTUs que aparecen mayoritariamente en alguno de los tratamientos:

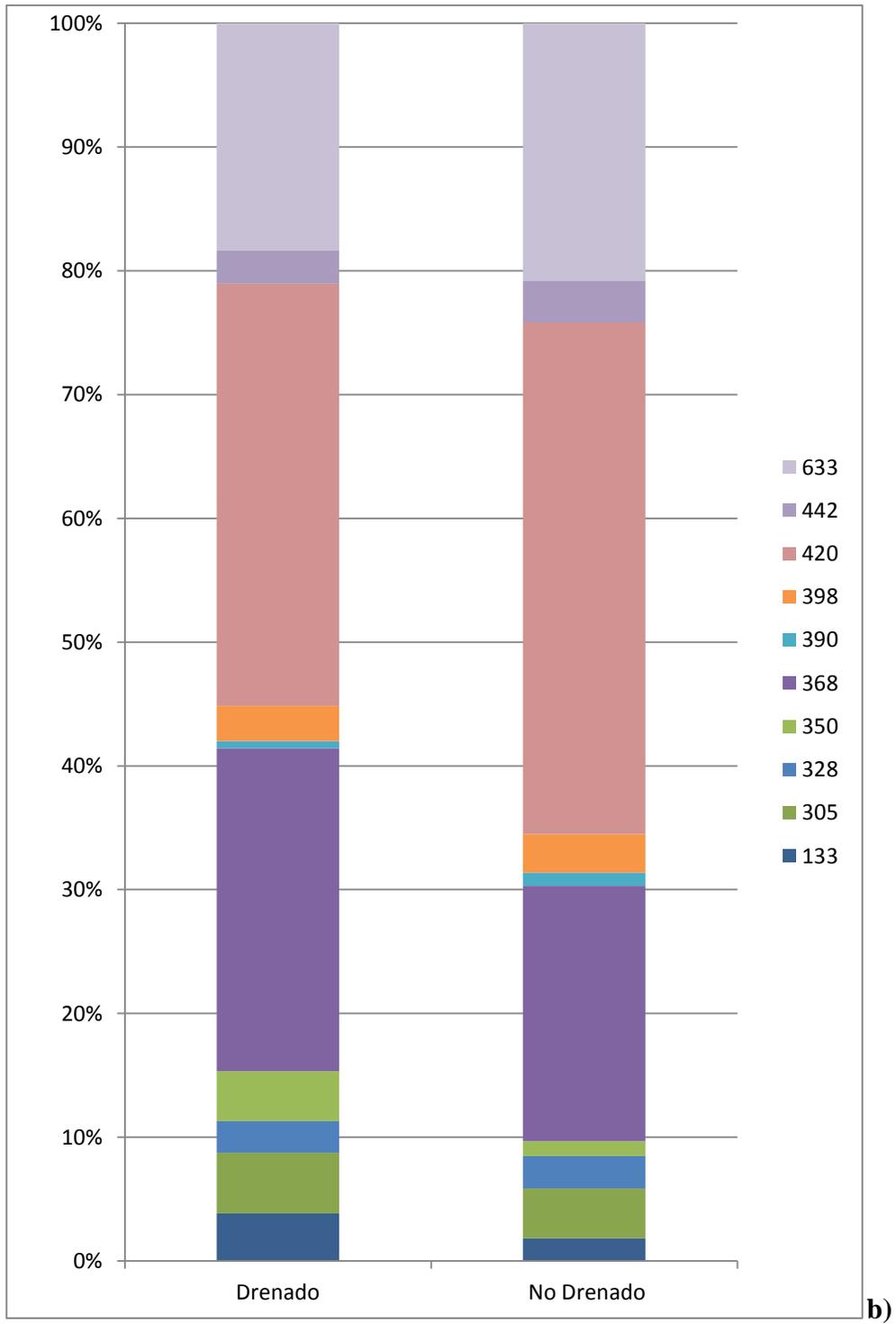
En el caso de la variable Cultivar (Figura 11a), se observa que las OTUs 133, 305, 368 y 390 fueron mayoritarias en el tratamiento Tacuarí, mientras que las OTUs 350, 398, 442 y 633 fueron mayoritarias en el tratamiento El Paso. Se destaca el aporte de 368 y 390 para el cultivar “INIA Tacuarí” y el aporte de 398 para “El Paso 144”. Las OTUs 328 y 420 estuvieron equitativamente repartidas en ambos tratamientos por lo que no resultaron definatorias en la variabilidad de las muestras.

En el caso del riego (Figura 11b), las OTUs que aparecieron mayoritariamente en el tratamiento Drenado fueron 133, 350 y 390; mientras que las demás OTUs fueron equitativamente repartidas en los dos suelos, ninguna fue mayoritaria en el tratamiento No Drenado. Estas diferencias no son de la misma magnitud que en el caso del cultivar, en especial para las OTUs más abundantes (368, 420 y 633) que se distribuyen equitativamente entre los tratamientos.

Finalmente, las OTUs 350, 390, 398 y 442 no fueron registradas en la fecha A; siendo 390 especialmente mayoritaria durante la fecha D. La OTU 368 fue la única mayoritaria en las primeras etapas del cultivo y las OTUs 133, 305, 328, 420 y 633 fueron equitativamente repartidas a lo largo del cultivo (Figura 11c).

Las OTUs 368, 420 y 633 fueron las más abundantes en todos los tratamientos (Figura 12). En el caso del cultivar El Paso, las OTUs 350, 398, 442 y 633 fueron más abundantes que en el cultivar Tacuarí; siendo el caso contrario para 133, 305 y 368 (Figura 12a). En el caso del riego (Figura 12b), las mayores diferencias fueron observadas para las OTUs 133, 350 y 420 siendo ésta última más abundante en el tratamiento No Drenado al igual que 633 y contrariamente a 133 y 350. La fecha A exhibió menor riqueza ya que se observa una menor cantidad de OTUs que en el resto de las fechas, lo cual se había observado en los índices (Figura 12c). Las OTUs 350, 390, 398 y 442 se encuentran en el perfil a partir de la fecha B y van disminuyendo en las fechas C y D salvo 398 que permanece relativamente estable y 390 que va aumentando hasta llegar a su valor máximo en la fecha D. Para todas las variables de estudio, los desvíos estándar fueron elevados (datos no incluidos) por lo que existe a una importante variabilidad dentro del mismo tratamiento (cultivar, riego y fecha) que podrá ser mejor apreciada en el análisis estadístico.





b)

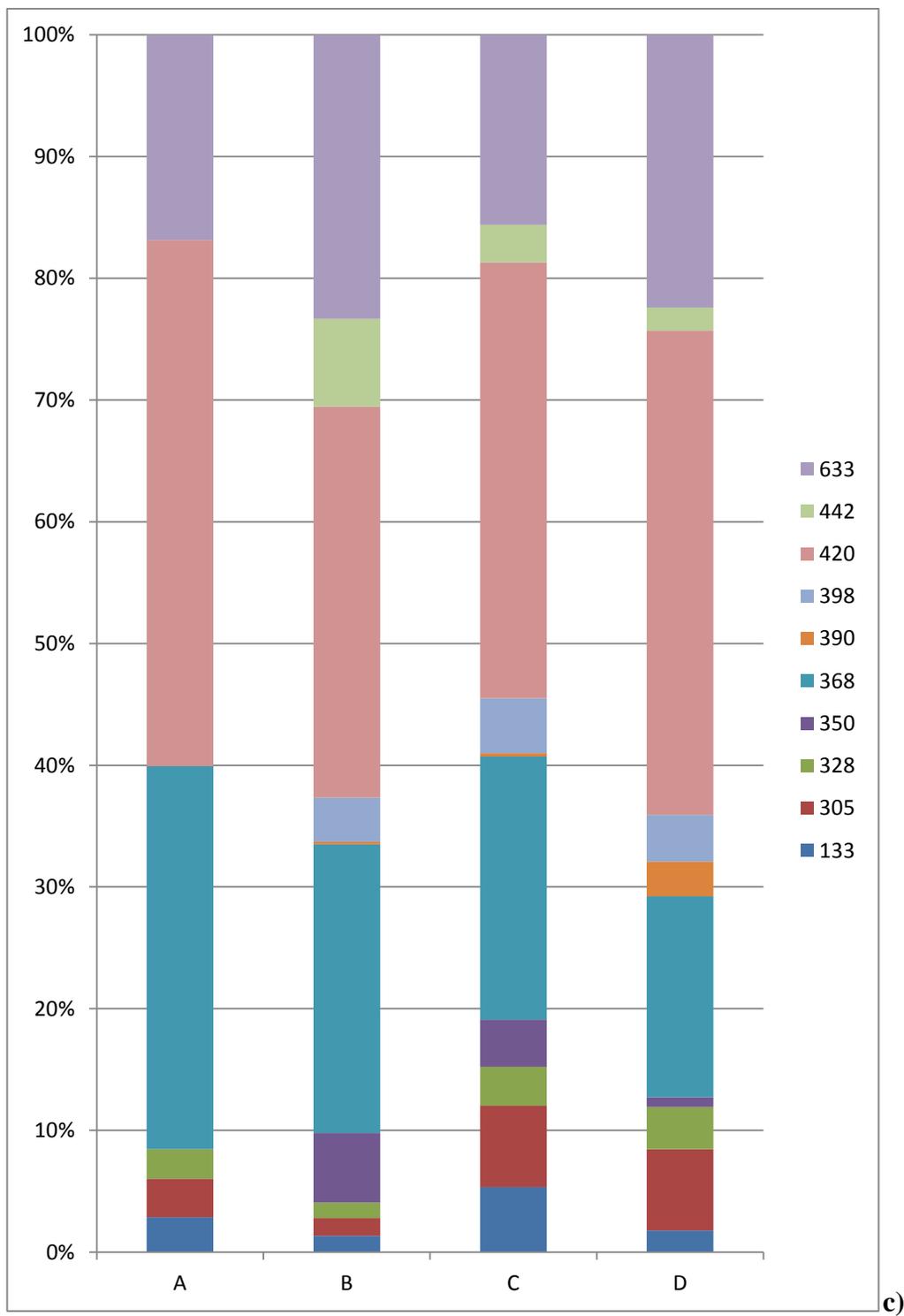


Figura 12. Distribución de los promedios de las áreas relativas y ordenadas según: (a) cultivar, (b) riego, (c) fecha de muestreo **A** (macollaje), **B** (primordio floral), **C** (luego del drenado) y **D** (cosecha).

Solamente 2 componentes (Figura 14) resultaron significativos dentro del análisis, y representan el 80% de la variación total de los datos. El primer componente explica el 66% de la variación mientras que el segundo explica el 14%.

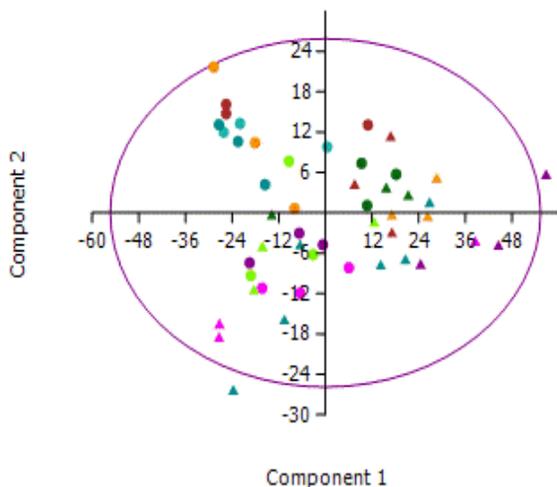
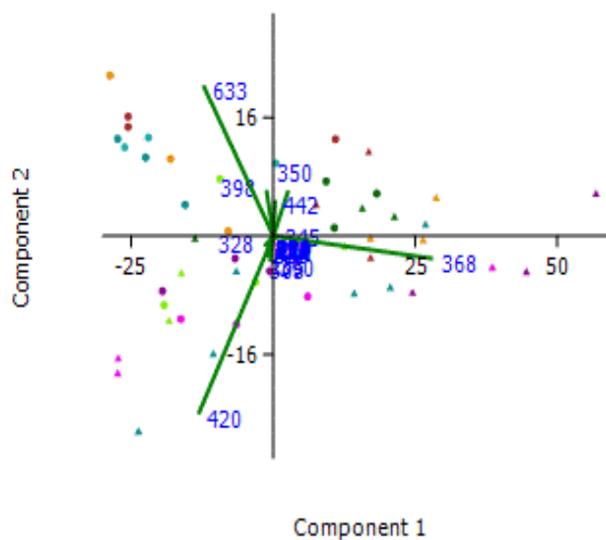
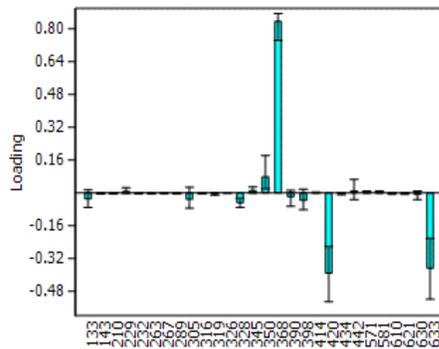


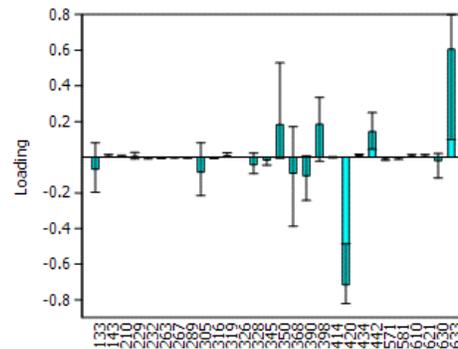
Figura 15. “Scatter Plot” del Análisis multivariado PCA realizado para la totalidad de las muestras. La elipse representa el intervalo de confianza 95%. Los círculos corresponden a las muestras del cultivar El Paso, los triángulos a las muestras Tacuarí; los colores rosado y violeta corresponden a las muestras de la fecha A Drenadas, y No Drenadas respectivamente; marrón y naranja corresponden a la fecha B Drenados y No Drenados respectivamente; verde oscuro y verde claro a la fecha C Drenados y No Drenados respectivamente; celeste y turquesa a la fecha D Drenados y No Drenados respectivamente.

Figura 16. El “biplot” representa a las OTUs que generaron mayor variabilidad en el conjunto de datos para los dos componentes analizados en un espacio bidimensional.





Componente 1



Componente 2

Figura 17. “Loading Plots” correspondiente al análisis multivariado PCA realizado para la totalidad de las muestras analizadas y para los dos componentes significativos del estudio. Se muestran las cargas de los coeficientes utilizados de cada OTU para construir cada componente

Solamente dos de las muestras analizadas se ubicaron por fuera de la elipse que reagrupa las muestras incluidas en el intervalo de confianza 95%, (Figura 15), ambos corresponden a muestras de Tacuarí Drenado en las fechas B y D. Las cargas de los coeficientes (Figura 17) y el “Biplot” (Figura 16) permiten identificar las OTUs más determinantes para explicar las variaciones recogidas en el análisis y de qué manera las determinan. Las OTUs 368, 420 y 633 que fueron las más abundantes del estudio, generan la mayor parte de la variabilidad en ambos componentes por lo que además son las variables más significativas de estudio. La OTU 368 generó mayor variabilidad sobre el eje del componente 1, el cual explica la mayor parte de la variación; mientras que las OTUs 420 y 633 segregan de manera opuesta los datos sobre el eje del componente 2, 420 hacia valores negativos y 633 hacia valores positivos.

La Figura 18 representa los “Scatter Plots” obtenidos al segregar por variable de estudio.

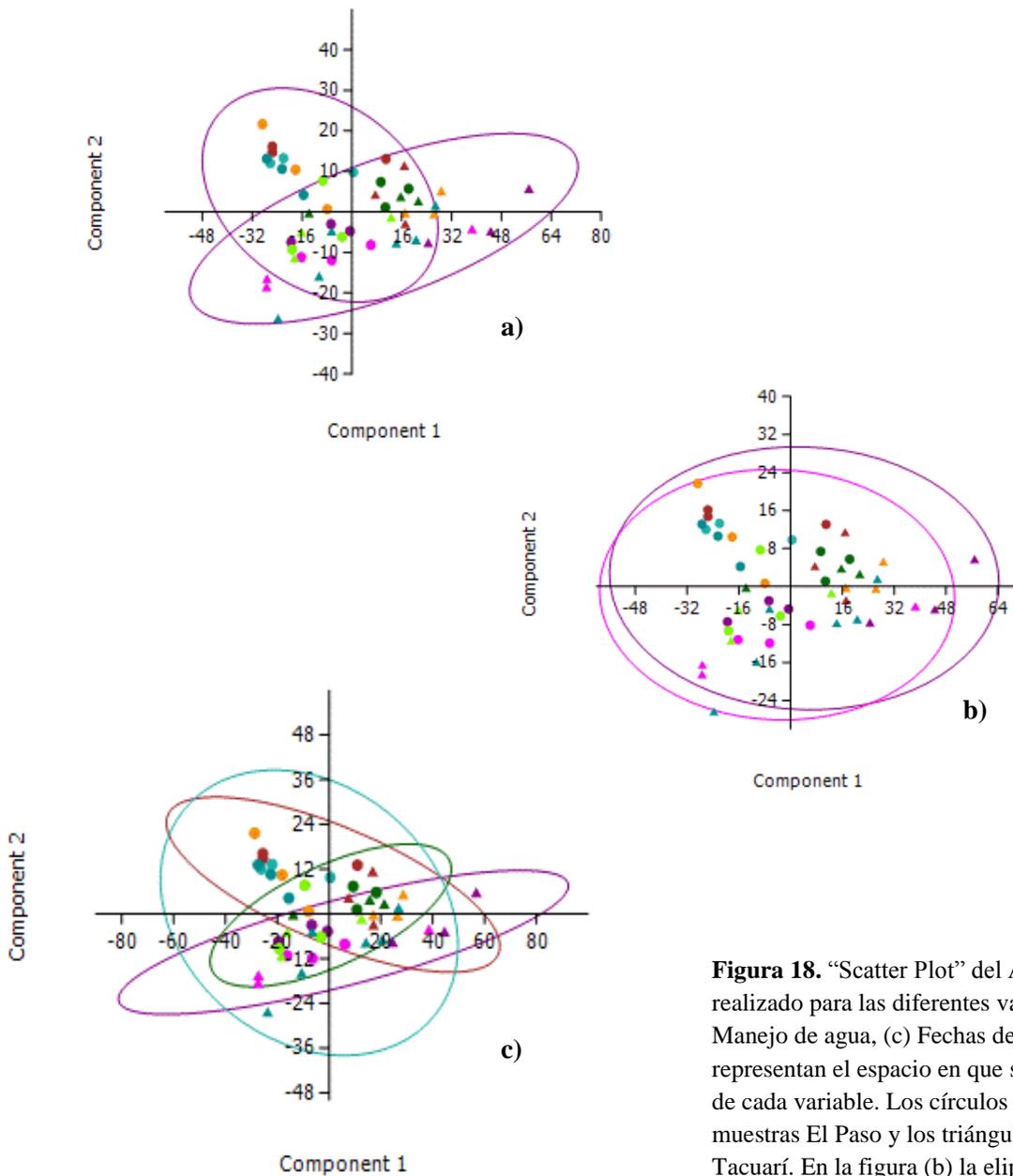


Figura 18. “Scatter Plot” del Análisis multivariado PCA realizado para las diferentes variables (a) Cultivar, (b) Manejo de agua, (c) Fechas de muestreo. Las elipses representan el espacio en que se ubican 95% de los datos de cada variable. Los círculos corresponden a las muestras El Paso y los triángulos a las muestras de Tacuarí. En la figura (b) la elipse violeta corresponde a las muestras “Drenadas” y la elipse fucsia a las muestras “No Drenadas. En la figura (c) la elipse fucsia corresponde a la fecha A (macollaje), la elipse roja a fecha B (primordio floral), la elipse verde a la fecha C (luego del drenado) y la elipse celeste a la fecha D (cosecha).

La variable que más diferencia los datos es el “Cultivar” (Figura 18 (a)) y luego la variable “Fecha” (Figura 18 (c)). La variable “Riego” (Figura 18 (b)) no diferencia los tratamientos de drenaje, ya que las elipses de 95% de confianza se solaparon.

Es interesante notar que en el caso del Cultivar (Figura 18 (a)), las muestras que quedaron por fuera de la elipse del tratamiento contrario (o muestras exclusivas) se segregaron según los ejes marcados previamente por las OTUs dominantes (Figura 16). Las muestras de Tacuarí que quedaron por fuera de la elipse de El Paso fueron segregadas sobre el eje del componente 1 (es decir con mayor influencia de las OTUs dominantes, destacándose 368 para los valores positivos y de 420 y 633 para los negativos), mientras que inversamente, las muestras de “El Paso 144” que escaparon de la elipse de “INIA Tacuarí” se segregaron mayoritariamente sobre el eje del componente 2 (con mayor influencia de 633 ya que los datos eran positivos). Es decir que el cultivar “INIA Tacuarí” permite un mayor desarrollo de 368, mientras que en el suelo de “El Paso 144” domina 633.

Para el caso de las fechas (Figura 18 (c)), se visualizan ciertas diferencias destacables como entre las fechas A y B; y las fechas B y C; siendo A y C las más similares entre sí. La comunidad variaría mayoritariamente en la fecha B que corresponde al momento de la aparición del primordio floral, la cual tendría mayor relación con las OTUs 368 y 633 que con 420, siendo la fecha A la que incluye la mayoría de los datos que se distribuyen sobre el eje de 420 (Figura 16). De este modo, 420 estaría mayoritariamente asociada al comienzo del desarrollo de la planta, previo a la inundación; mientras que 368 y 633 se asociarían a etapas de desarrollo más tardías y con mayor desarrollo de raíces en suelo inundado. La fecha D es la que tiene un aporte más equitativo de las tres OTU mayoritarias.

Discusión

Biblioteca de ADN del gen *amoA* arqueano

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de las secuencias de la biblioteca génica, se pudo amplificar específicamente el gen *amoA* arqueano. Las secuencias obtenidas mostraron un alto grado de homología con el gen *amoA* de arqueas no cultivadas de la base de datos NCBI. Las secuencias de los 21 clones tuvieron altos porcentajes de homología con secuencias parciales pertenecientes en su mayoría a clones de *phylum* indefinido o pertenecientes al *phylum Crenarchaeota*, (la comparación se realizó con la colección nucleotídica de la base de datos GenBank) lo cual coincide con los resultados obtenidos por otros investigadores.

Leininger et al. (2006), realizaron un estudio de la comunidad activa de arqueas oxidadoras de amonio en diferentes ambientes edáficos pertenecientes a tres zonas climáticas. Mediante retrotranscripción, obtuvieron cADN (ADN copia) que utilizaron para generar una biblioteca génica tanto con ARN 16S como con el gen *amoA*. La abundancia estimada en cantidad de copias de ambos genes resultó similar, y todas las copias de ARN 16S pertenecieron al *Phylum Crennoarchaeota*.

Glasser et al. (2010) también encontraron resultados similares para el gen *amoA* arqueano de suelos plantados con cebada, ya que la totalidad de sus secuencias quedaron posicionadas, al igual que Leininger y colaboradores, en uno de los clusters de arqueas con origen edáfico no cultivadas del *Phylum Crennoarchaeota*.

Ying et al. (2010), obtuvieron resultados similares con el gen 16S rDNA al realizar una biblioteca génica de AOA en suelos rojos ácidos. Las secuencias que analizaron pertenecieron a dos grupos dentro del *Phylum Crennoarchaeota*. Sin embargo su análisis del gen *amoA* arqueano demostró afiliación con el cluster edáfico solamente para uno de los clones estudiados.

Los estudios de Chen et al. (2011) y de Hofferle et al. (2010) también han mostrado una mayor variabilidad que Glasser y colaboradores en las filogenias obtenidas a partir de bibliotecas génicas para el gen *amoA* arqueano. Las muestras que estudiaron Chen y colaboradores fueron tomadas de un suelo rojo ácido plantado con arroz, y obtuvieron homologías de los clones secuenciados con representantes de un cluster “marino”. En el caso de Hofferle y colaboradores, el estudio se realizó en suelos de humedales, y la biblioteca génica de AOA demostró afiliación tanto con un cluster edáfico como con uno marino, según la profundidad en que fuera tomada la muestra.

En el presente estudio tres de los clones de *amoA* tuvieron altos grados de homología con ejemplares secuenciados del *phylum Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet et al., 2008), el cual ha sido recientemente reportado como el nuevo *phylum* donde se ubicarían algunos ejemplares que habían sido previamente ubicados dentro de *Crenarchaeota* (Spang et al., 2010). Esto fue propuesto a partir de los genomas de dos especies: *Nitrosopumilus maritimus*, representante de AOA pertenecientes al cluster marítimo; y *Nitrososphaera gargensis* representante del cluster edáfico. Ambas especies previamente mencionadas exhibieron homología con los clones secuenciados en el presente estudio. Al comparar los 21 clones con organismos totalmente secuenciados de la base de datos NCBI, se obtuvo que uno de los 21 clones tuvo 73% de homología con el gen *amoA* de *Nitrosopumilus maritimus*; y 11 clones tuvieron altos grados de homología con el gen *amoA* de *Nitrososphaera gargensis* (entre 79 y 86%). No obstante, 9 clones tuvieron altos grados de homología con el gen *amoA* de *Nitrosoarchaeum limnia* (entre 76 y 80 %). Sin embargo, 8 de estas secuencias constituyeron un grupo distinguible de los otros dos géneros en el árbol de *Neighbour Joining*. De entre los clones analizados, este grupo resultó ser el menos variable ya que todos los ejemplares que tuvieron homología con *Nitrosoarchaeum limnia* tuvieron el mismo sitio terminal de corte con *MboI*; mientras que los clones que exhibieron homología con *Nitrososphaera gargensis* presentaron 5 cortes enzimáticos terminales diferentes, por lo que han demostrado ser más variables las secuencias dentro de la misma especie en el presente estudio y para la enzima *MboI* en particular.

La definición de especie bacteriana y la determinación de la variabilidad intra-específica de un gen procariota es un desafío, debido en parte, a la transferencia horizontal de genes en procariotas. Es por ello que no podemos concluir con certeza acerca de la variabilidad intra-específica; además, los grados de homología no nos permiten afirmar con total certidumbre que las secuencias obtenidas pertenezcan a un organismo de determinada especie.

Nitrososphaera gargensis fue la primera especie en ser caracterizada como oxidadora de amonio termofílica (Hatzenpichler et al., 2007). Es representante de ambientes edáficos perteneciente al cluster I 1b de arqueas. Este cluster, compuesto por organismos que habitan el suelo, es el más conocido y documentado de arqueas oxidadoras de amonio (Francis et al., 2005). Esta especie fue caracterizada a partir de un enriquecimiento de aguas termales, y se ha demostrado experimentalmente su capacidad fijadora de CO₂. Su preferencia por ambientes termófilos reinstala el debate sobre el origen termófilo de las AOA, y se ha propuesto que los representantes mesófilos (crenoarqueotas) de sus descendientes, habrían adquirido evolutivamente una adaptación secundaria a temperaturas más bajas (Hatzenpichler et al., 2007).

Nitrosoarchaeum limnia fue descrita hasta el momento a partir de aislamientos que pertenecen a microorganismos provenientes de ambientes acuáticos, los cuales están adaptados a bajas presiones parciales de O₂ y ambientes de baja salinidad (Mosier et al., 2012)

El aislamiento de *Nitrosopumilus maritimus* (cepa SCM1) permitió confirmar su capacidad quimioautolitótrofa a partir de amonio. Es una especie representante del cluster marino de *Crenoarchaeota* que posee adaptaciones fisiológicas a las condiciones oligotróficas críticas que se encuentran en mar abierto, y que se caracteriza por tener alta afinidad por los sustratos que utiliza. De entre los oxidadores de amonio, *Nitrosopumilus maritimus* ha demostrado ser capaz de crecer a concentraciones extremadamente bajas de amonio en el mar (Walker et al., 2010).

Estructura poblacional de AOA

La estrategia de amplificación utilizada

Debido a la dificultad presentada para obtener una concentración suficiente de producto de PCR del gen *amoA* arqueano, se optó por una estrategia de PCR en dos rondas. En la segunda ronda se utilizó como molde el producto de PCR de la primera ronda, similar a una PCR anidada pero con el mismo par de cebadores en cada reacción. De esta manera, se obtuvo una concentración de ADN suficiente para detectar la señal del fluoróforo de los fragmentos terminales. En la segunda ronda de PCR se usó el cebador “forward” marcado con FAM para su posterior detección por capilares en el análisis de T-RFLP.

Análisis de la estructura poblacional de arqueas oxidadoras de amonio

Los resultados del análisis de T-RFLP mostraron datos comparativos para los diferentes tratamientos estudiados. Se encontraron diferencias significativas en los índices de diversidad y equitatividad entre los cultivares y entre las fechas de muestreo.

✓ *La importancia de la interacción planta-microorganismo*

Se obtuvo una mayor diversidad para la variedad índica “El Paso 144” que para la variedad japónica “INIA Tacuarí”. “El Paso 144” es una variedad de ciclo largo que posee una fase vegetativa que puede ir desde 70 hasta 140 días. Por otra parte, “INIA Tacuarí” es una variedad precoz donde la fase reproductiva comienza alrededor de los 40 días después de la siembra (ACA, 2012; Olmos, 2007). La fase vegetativa de la planta de arroz, es la fase de crecimiento de la planta en la que también se desarrollan las raíces aunque éstas continúen su crecimiento en la fase reproductiva.

Sin embargo el experimento en invernáculo no presentó diferencias en los tiempos de formación de macollos, por lo que se inundaron ambas variedades a los 50 días de la siembra aproximadamente con 3 días de diferencia entre ellas. Se inundó al momento del macollaje, el cual comienza cuando la planta ya está establecida y termina en la fase reproductiva cuando aparece el primordio floral (Olmos, 2007). Las condiciones controladas del invernáculo no permitieron observar las diferencias entre un ciclo corto y

uno largo, lo cual pone en duda si las plantas se desarrollaron de la misma manera, ya que una variedad (“INIA Tacuarí”) estaba adaptada a macollar en forma temprana pero se retrasó por 10 días, mientras que la otra de ciclo largo (“El Paso 144”) se adelantó de aproximadamente 20 días. Las condiciones experimentales podrían haber acelerado el proceso vegetativo de “El Paso 144”, el cual podría haber sido mayor que el esperado en condiciones de campo.

Ha sido demostrado por otros investigadores la especificidad de las comunidades microbianas de la rizósfera con las raíces de cada cultivar (Phillipot & Hallin, 2011; Hardoim et al., 2011). Esto puede deberse a los exudados de las plantas y su relación con la microbiota que la rodea, lo cual ha sido catalogado como el factor de mayor variabilidad entre comunidades microbianas (Hardoim et al., 2011). Es posible que las comunidades asociadas a la rizósfera de ambas variedades también sean distintas estructuralmente, lo cual explicaría las diferencias observadas en este estudio.

Por otro lado, la diversidad fue menor para la fecha de muestreo A, que corresponde al macollaje de las plantas de arroz, etapa en que las raíces aún están en desarrollo. Precisamente como se realizó la inundación del cultivo al macollaje, la comunidad relevada en esa fecha correspondería al cultivo vegetativo pre-inundado o de seco. Las fechas posteriores relevan la comunidad existente luego de instalada la inundación, por lo que se puede concluir que el momento de la inundación marca un cambio estructural en la diversidad de la comunidad de oxidadores de amonio.

A pesar de la limitación de oxígeno generada por la inundación, las raíces que continúan su crecimiento luego de inundado el cultivo podrían proveer los recursos suficientes para el desarrollo de la comunidad de arqueas oxidadoras de amonio asociada. Esto podría explicar que la diversidad sea mayor luego de la inundación. Se ha reportado que las comunidades que emiten el N_2O son diferentes durante el período de seco y durante la inundación (Xing et al., 2009), lo que está de acuerdo con nuestros resultados para el caso de las AOA.

La interacción planta-microorganismo ha demostrado ser compleja. En el caso de la nitrificación, se ha observado que las plantas pueden inhibir o potenciarla. Existen plantas que poseen inhibidores de la amonio monooxigenasa (AMO) y de la hidroxilamina

oxidorreductasa (HAO) (Phillipot & Hallin, 2011). Por otro lado, ha sido demostrado que las raíces de las plantas de arroz realizan un intercambio de oxígeno con la rizósfera, el cual permite tanto la nitrificación como la posterior desnitrificación al liberarse NO_3^- al ambiente rizosférico (Arth et al., 1998; Phillipot & Hallin., 2011). Es posible en este caso que la comunidad rizoférica sea más diversa que la que reside en la capa superficial del suelo durante el período de secano y que sea específica del cultivo utilizado.

✓ *La diversidad de arqueas oxidadoras de amonio en el suelo de arroz*

El dominio cuantitativo de las AOA con respecto a las AOB, y su evolución poblacional frente a diferentes ambientes aún está en discusión. Algunos investigadores plantean que las AOA serían más sensibles a cambios en el pH del suelo (Ying et al., 2010; Nicol et al., 2008), siendo diferentes los clusters de arqueas que se encuentran en suelos con diferente valor pH (Pereira e Silva, 2013). También se ha propuesto que las comunidades varíen según la fertilización nitrogenada (Wessen et al., 2010), o según la profundidad del suelo (Hofferle et al., 2010).

Por otro lado, otros investigadores plantean que el factor más importante para la emisión de N_2O es la cantidad de días en que el suelo permanece seco o inundado, lo cual estaría relacionado con la preferencia por ambientes con mayor disponibilidad de O_2 de los microorganismos nitrificantes (Xing et al., 2009; Towprayoon et al., 2005). Sin embargo no se especifica que dicha emisión se deba particularmente a las AOA, por lo que no estarían afectadas directamente por la disponibilidad de O_2 para realizar la oxidación del amonio. Es posible que sean capaces de adaptarse al ambiente en que se encuentren, aunque éste se vuelva más restrictivo (Hofferle et al., 2010).

Chen y colaboradores (2011) han detectado entre 8.31×10^7 y 2.12×10^8 copias del gen *amoA* arqueano por gramo de suelo seco en suelos anóxicos. En el mismo sentido, otros investigadores han demostrado la ubicuidad de la presencia de AOA en ambientes muy diversos, especialmente en ambientes bajos en O_2 (Francis et al., 2005) o de baja salinidad (Mosier et al., 2012). Se ha demostrado la presencia de AOA en biorreactores de lodo activado (Park et al., 2006) y en el Mar Negro, la cuenca permanentemente estratificada más grande del mundo, cuyas aguas son anóxicas en un 90% y con un alto

contenido de sulfuros desde los 100m hasta el fondo, a unos 2200m. En estas aguas, Coolen et al., 2007 encontraron poblaciones de AOA, las cuales podrían estar unidas a la presencia de bacterias que realizan ANAMOX (oxidación del amonio anoxigénica) que utilizarían el nitrito que proveen las AOA.

En el presente estudio se detectaron clones homólogos a *Nitrosoarchaeum limnia*, microorganismo adaptado a vivir en condiciones restrictivas de O₂, por lo que es posible que algunas poblaciones de AOA detectadas en el análisis de T-RFLP sean capaces de vivir en estas condiciones. Al menos parte de la comunidad relevada podría estar adaptada a estas condiciones lo cual explicaría que se encuentren aún después de inundado el suelo.

Los T-RFs más abundantes y significativos obtenidos en este estudio (368, 420 y 633) no coinciden con los que fueron obtenidos previamente por otros investigadores que realizaron la técnica de T-RFLP en *amoA* de arqueas con la enzima MboI. Sin embargo algunos de los T-RFs más significativos del presente estudio distaron de muy pocos pares de bases con los obtenidos por Chen y colaboradores (2011) que obtuvieron los T-RFs 371 y 422; o por Hofferle y colaboradores (2010) que utilizaron un cebador distinto CrenamoA23F (5'-ATGGTCTGGCTWAGACG-3') marcado con FAM y obtuvieron entre otros, el T-RF 419 y T-RFs mayores a 500 pares de bases que no fueron especificados, entre los cuales podría encontrarse 633. El cebador CrenamoA23F es muy similar al utilizado en el presente estudio ya que posee solamente 3 pares de bases menos.

Debido a que diferencias técnicas al momento de la lectura mediante capilares distintos podría originar pequeñas diferencias en el largo del fragmento terminal obtenido, es probable que dichos T-RFs sean los mismos que los obtenidos en el presente estudio.

Ninguno de los T-RFs obtenidos coincidió con la digestión *in silico* realizada para la construcción de la biblioteca génica, por lo que no se pueden relacionar directamente los T-RFs con las secuencias de la biblioteca. Sin embargo, si se tiene en cuenta que podría haber algunos pares de bases de diferencia con respecto a los resultados del T-RFLP, los T-RFs más cercanos obtenidos *in silico* son 301, comparable con la OTU 305, y 323 comparable con las OTUs 319 y 326. Ambas digestiones *in silico* se correspondieron con la especie *Nitrososphaera gargensis*. En este caso la biblioteca génica recoge una pequeña parte de la riqueza del estudio, debido a que solamente se analizaron 20 clones al azar de

una muestra específica, ya que el objetivo principal de la biblioteca fue confirmar la especificidad de los cebadores. Sería interesante identificar estos T-RFs con el fin de comprender en mayor profundidad los efectos que tienen las plantas de arroz sobre la comunidad de microorganismos oxidadores de amonio que conviven en la rizósfera, sobre todo en lo que respecta a alelopatías provocadas por la producción de exudados, los cuales son liberados por las raíces hacia el entorno circundante.

El análisis multivariado confirmó lo observado en los histogramas realizados con los promedios de las áreas relativas. Los T-RFs que habían sido definidos como mayoritarios (368, 420 y 633), fueron los responsables de segregar los datos sobre los ejes de los componentes principales, y por lo tanto explican la mayor parte de la variabilidad del estudio. Cerca del 80% de la variación de los datos quedó explicado con los primeros dos componentes del análisis, y los tres T-RFs mayoritarios segregaron los datos sobre el eje del primer componente (66%), con un aporte destacable de 368; mientras que 420 y 633 segregaron mayoritariamente los datos sobre el eje del segundo componente (14%).

✓ *La planta de arroz y su relación con la diversidad de AOA*

La variabilidad de la estructura poblacional de AOA en este experimento demostró estar influenciada por el cultivar, mientras que el manejo de agua aplicado no tuvo efecto sobre ella. A su vez la comunidad cambió junto con el cultivo en estrecha relación con su crecimiento. Podríamos inferir a partir de este análisis que las muestras de Tacuarí se relacionan en mayor medida con las OTUs 368 y 420, mientras que las muestras de El Paso se corresponderían con la abundancia de 633. En el caso de las fechas, se observó que habría un aporte mayoritario de las OTUs 368 y 420 en el macollaje en momentos previos a la inundación; luego ocurriría un cambio en la comunidad que respondería principalmente a 633, ya que su abundancia relativa aumenta en las fecha B y D, disminuyendo transitoriamente en la fecha C. Además, se ha observado que algunos T-RFs (350, 398 y 442) solamente aparecen a partir de la fecha B, luego de que se inundara el cultivo. Aunque no sean las OTUs mayoritarias en abundancia relativa, entre las tres suman alrededor de un 20% de la abundancia total lo cual implica un cambio estructural. Esto podría estar explicado por el establecimiento de la inundación y la consecuente modificación del

ambiente rizosférico, que permitió el crecimiento de organismos que antes no crecían. Es interesante notar que este efecto de la inundación es independiente del drenado.

En la fecha C se observa un patrón similar a lo previamente observado en A, lo cual tal vez se deba a una adaptación frente al cambio drástico ocurrido, siendo la elipse más equitativa que en B entre las OTUs dominantes. Esta fecha también corresponde al momento en que se drenó el cultivo. En la bibliografía se ha documentado que el retiro del agua aumenta drásticamente las emisiones de N_2O debido a que el suelo se oxigena nuevamente (Liu et al., 2010), sin embargo dicho estudio no especifica a qué comunidad de microorganismos se debe ese cambio. En el presente estudio, esta fecha no parece ser significativamente diferente de las demás, lo que concuerda en este sentido con que no se haya detectado diferencias entre los tratamientos Drenado y No Drenados.

Finalmente en la cosecha (fecha D), se puede apreciar que la elipse tiene un mayor impacto de cada OTU dominante pero éste permanece siendo equitativo entre ellas, incluyendo a la gran mayoría de las muestras. Esto podría significar una estabilización de la comunidad que comenzó a visualizarse en la fecha C.

Esta sucesión poblacional que acompaña el crecimiento del cultivo es consecuente con el hecho de que la comunidad cambie según el cultivar utilizado, ya que denota una relación estrecha entre la comunidad de AOA y la planta de arroz. La ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos Drenados y No Drenados en el presente estudio es inesperada. Se había previsto que este tratamiento tuviera efecto sobre la comunidad debido al aporte de O_2 realizado durante el drenaje, permitiendo un mayor desarrollo de la comunidad aeróbica de oxidadoras de amonio. Al no haberse realizado un análisis cuantitativo como PCR en tiempo real en el presente estudio, no es posible comparar la abundancia de las AOA en los diferentes tratamientos. Solamente con esta información cuantitativa se hubiese podido concluir que el manejo de agua de este experimento no afectó la comunidad de AOA.

Por un lado, esto puede deberse a que la comunidad de AOA relevada podría ser capaz de desarrollarse de igual manera entre un ambiente aerobio y uno anaerobio. Es probable que muchos de los organismos se encuentren en estado latente durante las fases anaerobias, y aún así estar representados en los perfiles de T-RFLP. El ADN edáfico

estudiado no diferencia los organismos activos de los inactivos, por lo que sería interesante analizar las poblaciones activas de AOA mediante ADN copia por ejemplo.

Por otro lado, tal vez el cultivo debería haber permanecido drenado durante más tiempo para asegurar que no existe efecto del drenado sobre la estructura poblacional. Sería interesante analizar la comunidad de AOA entre tratamientos de drenados distintos. Un posible tratamiento alternativo sería drenar el agua durante una mayor cantidad de días, lo cual implicaría una mayor exposición del suelo al O_2 , aumentando las poblaciones de nitrificantes que allí habitan. Otro tratamiento alternativo podría ser drenar el agua en más de una ocasión durante el ciclo de cultivo, como fue realizado en el estudio de Liu y colaboradores (2010), el cual demostró que una mayor frecuencia del retiro de agua aumentaría las emisiones de N_2O , lo cual estaría asociado a las comunidades nitrificantes.

Es posible que en estas condiciones la comunidad de AOA varíe entre un tratamiento Drenado y No drenado. Esta información permitirá definir con mayor certeza el rol del manejo del agua en el cultivo sobre la comunidad de AOA.

Conclusiones y Perspectivas

Este estudio permitió una primera aproximación a la caracterización de las comunidades microbianas oxidadoras de amonio responsables, entre otras, de las emisiones de N_2O . La variabilidad de la estructura poblacional de AOA en este experimento demostró estar influenciada por el cultivar, mientras que el manejo de agua aplicado no tuvo efecto sobre ella. A su vez la comunidad cambió junto con el cultivo en estrecha relación con la edad fisiológica de la planta, por lo que en este estudio queda demostrado el vínculo entre el desarrollo de la planta y los microorganismos que habitan el suelo.

Si bien se ha planteado la dominancia cuantitativa de AOA frente a las AOB, recientemente ha sido planteado que éstas últimas serían determinantes para la oxidación del amonio, mientras que las AOA serían más estables frente a modificaciones ambientales. El obtener resultados comparables de las AOB, de bacterias desnitrificantes, y de bacterias que realizan ANAMOX en suelos de arrozales uruguayos constituiría un gran aporte a la comprensión de la dinámica de las emisiones de N_2O en nuestro país. También sería de gran relevancia realizar estos estudios a campo y durante más de un ciclo de cultivo, incluyéndose las rotaciones. Esto permitiría en un futuro la utilización de prácticas agrícolas que disminuyan estas emisiones, generando un método de cultivo sustentable.

Bibliografía

- ACA (Asociación de Cultivadores de Arroz), 2012 Semillas, variedades utilizadas. Disponible en la Web: <http://www.aca.com.uy/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=13&Itemid=16>
- ACA (Asociación de Cultivadores de Arroz), Guía de buenas prácticas en el cultivo de arroz en Uruguay, Marzo 2013. Disponible en la web: <http://www.aca.com.uy/images/stories/GUIA_DE_BUENAS_PRACTICAS_marzo_2013.pdf#zoom=100>
- Applied Biosystems, Disponible en la Web: <http://marketing.appliedbiosystems.com/mk/get/PS1_login>
- Arth, I., Frenzel, P., & Conrad, R. (1998). Denitrification coupled to nitrification in the rhizosphere of rice. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(4), 509-515.
- Baethgen, W., Martino, D. (2000). Cambio climático, gases de efecto invernadero e implicancias en los sectores agropecuario y forestal del Uruguay. <<http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/le/pol/2002/informe-7.pdf>>
- Boone D.R., Whitman W.B. and Rouvière P. (1993) Diversity and taxonomy of methanogens. In Ferry J.G. (ed), *Methanogenesis*, pp. 35-80.; Editorial Springer Science+Business Media Dordrecht, originalmente publicado por Chapman and Hall Co., New York; ISBN 978-1-4613-6013-1/ISBN 978-1-4615-2391-8 (eBook).
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. & Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6(3), 245-252.
- Chen, X.P., Zhu, Y.G., Xia, Y., Shen, J.P., He, J.Z. (2008). Ammonia-Oxidizing Archaea: Important Players In Paddy Rhizosphere Soil? *Environmental Microbiology*. 10, 1978-1987.
- Chen X., Zhang L. M., Shen J. P., Wei W. X., He J. Z. (2011). Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil. *Biol. Fert. Soils* 47, 323–331.
- Conrad, R. (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Rev.* 60:609–640.
- Coolen MJL, Abbas B, van Bleijswijk J, Hopmans EC, Kuypers MMM, Wakeham SG et al. (2007). Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environ Microbiol* 9: 1001–1016.
- EPA (2006). Global Mitigation of Non-CO₂ Greenhouse Gases. Executive Summary
- Fernández Scavino, A., Menes, J., Ferrando, L. y Tarlera, S. (2010). Bacterial Community Analysis Of The Water Surface Layer From A Rice-Planted And An Unplanted Flooded Field. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41, 411-419.
- Fiencke, C., Spieck, E., Bock, E. (2005). Nitrifying Bacteria. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress.* 4, 255-276.
- Food and Agricultural Organization (FAO). *World Agricultural Towards 2015/2030. An FAO Perspective.* Rome: FAO; (2003)
- Francis, C. A., K. J. Roberts, J. M. Beman, A. E. Santoro, and B. B. Oakley. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:14683-14688.
- García, JL., Patel, B., Ollivier, B. (2000). Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of Archaea. In: *Anaerobe* 6:205-226.

- Glaser, K., Hackl, E., Inselsbacher, E., Strauss, J., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S., Sessitsch, A. (2010). Dynamics Of Ammonia-Oxidizing Communities in Barley-Planted Bulk Soil and Rhizosphere Following Nitrate and Ammonium Fertilizer Amendment. *FEMS Microbiology Ecology*. 74, 575-591.
- Goossens A., De Visscher A., Boeckx P. and Van Cleemput O. (2001). Two-year field study on the emission of N₂O from coarse and middle-textured Belgian soils with different land use. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 60: 23-34
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp
- Hardoim, P. R., Andreote, F. D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2011). Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS microbiology ecology*, 77(1), 154-164.
- Hatzenpichler R., Lebedeva E.V., Spieck E., Stoecker K., A. Richter, Daims H., Wagner M. (2007). A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008), pp. 2134–2139.
- Hofferle S., Nicol GW., Pal L., Hacin J., Prosser JI., Mandic-Mulec I. (2010) Ammonium supply rate influences archaeal and bacterial ammonia oxidizers in a wetland soil vertical profile. *FEMS Microbiol Ecol* 74:302–315
- Hou AX, Chen GX, Wang ZP, Van Cleemput O, and Patrick, WH Jr. (2000). Methane and nitrous oxide emissions from rice field in relation to soil redox and microbiological processes. *Soil Science Society of America Journal* 64, 2180-2186.
- INIA (2008). Programa Nacional de Investigación Producción Arroz [en línea] Disponible en Web: <<http://www.inia.org.uy/online/site/325754I1.php>>
- IPCC (1996) Intergovernmental Panel on Climate Change. The science of climate change. In: Houghton JT, Meira Filho LG, Callander BA, Harris N, Kattenberg A, Maskell K (eds) *Climate Change 1995*. Cambridge Univ Press, Cambridge, pp 572
- IPCC (2007) Intergovernmental Panel on Climate Change. Emisiones de GEI de larga permanencia en: IPCC Fourth Assessment Report: *Climate Change 2007*. Disponible en la Web: <http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/syr/es/mains2-1.html>
- Irisarri, P. (2010). Proyecto CSIC I+D.
- Jia Z, Conrad R (2009) Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environ Microbiol* 11:1658–1671
- Kirk, JL, Beaudette, LA, Hart, M, Moutoglis, P, Khironomos, JN, Lee, H, Trevors, JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Meth* 58: 169–188
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiological reviews*, 46(1), 43.
- Kowalchuk, G. A. & Stephen, J. R. (2001) AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55 , 485-529.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C. (2006). Archaea Predominate Among Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in Soils. *Nature*. 442, 806-809.
- Li, X., Yuan, W., Xu, H., Cai, Z., Yagi, K. (2011). Effect of timing and duration of midseason aeration on CH₄ and N₂O emissions from irrigated lowland rice paddies in China. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 91, 293-305.

- Liu, S., Qin, Y., Zou, J. y Liu, Q. (2010). Effects of Water Regime During Rice-Growing Season on Annual Direct N₂O Emission in a Paddy Rice–Winter Wheat Rotation System in Southeast China. *Science of the Total Environment*. 408, 906-913.
- Mosier, A.R. (1998). Soil Processes and Global Change. *Biology and Fertility of Soils*. 27,221-229
- Mosier AC, Lund MB, Francis CA. (2012). Ecophysiology of an ammonia-oxidizing 739 archaeon adapted to low-salinity habitats. *Microb Ecol* doi:10.1007/s00248-012-0075-1.
- NCBI, GeneBank, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponible en la Web:
<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., and Prosser, J.I. (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol* 10: 2966–2978.
- Nicolaisen, M.H., Risgaard-Petersen, N., Revsbech, N.P., Reichardt, W., Ramsing, N.B. (2004). Nitrification–Denitrification Dynamics and Community Structure of Ammonia Oxidizing Bacteria in a High Yield Irrigated Philippine Rice Field. 49, 359-369.
- Núñez, I. (2013). Historia del Cultivo de Arroz en Uruguay. INASE. Serie de Divulgación Técnica. Jornada de Arroz [en línea] Disponible en Web: <<http://www.inase.org.uy/files/docs7fa510bf1b002ab3.pdf>>
- Olmos, S. (2007). Apunte de Morfología, Fenología, Ecofisiología y Mejoramiento genético del arroz. Cátedra de Cultivos II Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Corrientes, Argentina. Disponible en la Web: <<http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar/academico/Apunte-MORFOLOGIA.pdf>>
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N. (2000). An Evaluation of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis for the Study of Microbial Community Structure and Dynamics. *Environmental Microbiology*. 2, 39-50.
- Park, H. D., G. F. Wells, H. Bae, C. S. Criddle, and C. A. Francis. (2006). Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5643-5647.
- Patra, A.K., Abbadie, L., Jossierand, A.C., Degrange, V., Grayston, S.J., Guillaumaud, N., Loiseau, P., Louault, F., Mahmood, S., Nazaret, S., Philippot, L., Poly, F., Prosser, J.I., Le Roux, X. (2006). Effects of Management Regime and Plant Species on the Enzyme Activity and Genetic Structure of N-Fixing, Denitrifying and Nitrifying Bacterial Communities in Grassland Soils. 8, 1005-1016.
- Pereira e Silva, M. D. C. (2013). The normal operating range of soil functioning: understanding the natural fluctuations of nitrogen cycling communities. University of Groningen. pp 149-177.
- Pereyra, V. (2009). Emisiones de Metano y Óxido Nitroso en Arrozales de la Zona Este del Uruguay: El Manejo de Cultivo como Factor Determinante. Pasantía de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Profundización en Biotecnología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay. pp 34.
- Philippot, L., & Hallin, S. (2011). Towards food, feed and energy crops mitigating climate change. *Trends in plant science*, 16(9), 476-480.
- Reilly, J. M., W. Baethgen, F. E. Chege, S. C. van de Geijn, E. Lin, A. Iglesias, G. Kenny, D. Patterson, J. Rogasik, R. Roetter, C. Rosenzweig, W. Sombroek and J. Westbrook (1996), 'Agriculture in a Changing Climate: Impacts and Adaptation', in R. T. Watson, M. C. Zinyowera and R. H. Moss, eds., *Climate Change 1995: Impacts, Adaptations and Mitigation of Climate Change - Scientific-Technical Analyses - Contribution of Working Group II to the Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 427–467.

- Shannon, C. y Weaver, W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana, IL: University of Illinois Press.
- Smith, K.A., Ball, T., Conen, F., Dobbie, K.E., Massheder, J., Rey, A. (2003). Exchange of Greenhouse Gases Between Soil and Atmosphere: Interactions of Soil Physical Factors and Biological Processes. *European Journal of Soil Science*. 54, 779-791.
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D.A., Wagner, M. & Schleper, C. (2010). Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends in Microbiology* 18(8), 331-340.
- Tarlera S., Pereyra, V., Fernández, A. (2009). En: *Emisiones de metano y óxido nitroso: Principales Gases de Efecto Invernadero Producidos por el Sector Agropecuario en Uruguay*. Irisarri, P. (Ed.). Montevideo, Universidad de la República. pp 69-79
- Torsvik, V, Daae, FL, Sandaa, RA, Ovreas, L (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol* 64: 53–62
- Towprayoon, S., Smakgahn, K., Poonkaew, S. (2005). Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from drained irrigated rice fields. 59, 1547-1556.
- Watanabe, A., Yamada, H., and Kimura, M. (2005). Analysis of temperature effects on seasonal and interannual variation in CH₄ emission from rice-planted pots. *Agric. Ecosyst. Environ.* 105, 439.
- Wessén, E., Hallin, S., Philippot, L., (2010). Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Wolsing, M., Priemé, A. (2004). Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments. *FEMS Microbiology Ecology*. 48, 261-271.
- Xing, G., Zhao, X., Xiong, Z., Yan, X., Xu, H., Xie, Y. & Shi, S. (2009). Nitrous oxide emission from paddy fields in China. *Acta Ecol. Sin.* 29: 45–50.
- Ying, J. Y., L. M. Zhang, and J. Z. He. (2010). Putative ammonia-oxidizing bacteria and archaea in an acidic red soil with different land utilization patterns. *Environ. Microbiol. Rep.* 2:304–312.
- Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K (2009) Temporal shifts in diversity and quantity of nirS and nirK in a rice paddy field soil. *Soil Biol Biochem* 41:2044–2051
- Zou J, Huang Y, Jiang J, Zheng X, Sass RL (2005) A 3-year field measurement of methane and nitrous oxide emissions from rice paddies in China: effects of water regime, crop residue, and fertilizer application. *Global Biogeochem Cycles* 19:GB2021
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:533–616.

ANEXO

❖ 1) Concentración de ADN en muestras de suelo luego del procedimiento de extracción mediante el kit comercial MoBio

Muestra	T1A	T2A	T3A	T5A	T7A	T8A	E1A	E2A	E3A	E4A	E5A	E7A
ng/μL	8,40	11,85	8,30	9,15	12,50	10,45	11,20	6,50	9,70	7,70	8,10	6,65
A260/A280	2,13	2,12	1,95	2,08	2,07	1,97	2,00	2,00	0,22	2,05	2,31	2,15
Muestra	T1B	T2B	T3B	T5B	T7B	T8B	E1B	E2B	E3B	E4B	E5B	E7B
ng/μL	10,10	11,40	9,10	7,40	7,80	8,80	12,30	9,50	13,50	13,90	14,50	15,00
A260/A280	1,84	1,44	1,71	1,67	1,50	1,73	1,80	1,83	1,63	1,76	1,66	1,69
Muestra	T1C	T2C	T3C	T5C	T7C	T8C	E1C	E2C	E3C	E4C	E5C	E7C
ng/μL	13,50	12,50	11,10	10,80	15,00	13,60	18,60	15,60	13,10	17,30	14,00	17,30
A260/A280	1,68	1,77	1,56	1,65	1,74	1,75	1,78	1,69	1,66	1,89	1,69	1,69
Muestra	T1D	T2D	T3D	T5D	T7D	T8D	E1D	E2D	E3D	E4D	E5D	E7D
ng/μL	11,00	15,50	10,60	27,00	20,80	10,70	14,20	57,40	12,20	20,40	15,50	15,30
A260/A280	2,31	2,19	2,75	2,05	2,18	2,56	2,08	1,96	2,09	2,12	2,12	2,25

❖ 2) Composición del Buffer de corrida electroforética TBE (5X)
(Concentración de Stock)

Buffer de corrida TBE 5X	
Tris	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA (0,5 M) pH=8	20 mL
H ₂ O	1 L

❖ 3) Tablas de Mezclas y Programas utilizados en el presente estudio

Mix PCR Miniprep	μL	Programa PCR Miniprep		X30
		°C	mm:ss	
Buffer Taq	2,5	95	03:00	
MgCl ₂	1,5	94	00:30	
dNTPs	2,5	60	00:30	
Cebador F PJET1.2	0,5	72	00:45	
Cebador R PJET1.2	0,5	72	10:00	
BSA	2	12	03:00	
Taq	0,1			
H ₂ O	15,4			
Total	25			

Mix PCR <i>archamoA</i>	μL
Buffer Taq 10X	2,5
MgCl ₂ 50mM	1
dNTPs 2mM	2,5
Cebador F 10mM	1,25
Cebador R 10mM	1,25
BSA 2%	1
DMSO puro	0,625
<i>Taq polimerasa</i>	0,1
H ₂ O	12,775
ADN	2
Total	25

Mix PCR 1ª ronda	μL
Buffer DreamTaq 10X	2,5
MgCl ₂ 50mM	1
dNTPs 2mM	2,5
Cebador F 10mM	1,25
Cebador R 10mM	1,25
BSA 2%	1
DMSO puro	0,625
DreamTaq	0,1
H ₂ O	12,775
ADN	2
Total	25

Programa PCR <i>archamoA</i> y 1ª ronda	
$^{\circ}\text{C}$	mm:ss
95	03:00
94	00:45
53	01:00
72	01:00
72	10:00
12	03:00

X30

Mix PCR 2ª ronda	μL
Buffer DreamTaq 10X	2,5
dNTPs 2mM	2,5
Cebador F 10mM	1
Cebador R 10mM	1
BSA 2%	1
DMSO puro	0,625
<i>DreamTaq</i>	0,1
H ₂ O	14,775
ADN	1,5
Total	25

Programa PCR 2ª ronda	
$^{\circ}\text{C}$	mm:ss
95	03:00
94	00:45
55	01:00
72	01:00
72	15:00
12	03:00

X20

Mix Digestión	μL
Buffer R	2
Mbo I	0,5
Muestra de ADN	x
H ₂ O	20-(2,5+x)
Total	20

Programa de Digestión para MboI	
$^{\circ}\text{C}$	hh:mm
37	04:00
80	00:20

❖ 4) Matriz de datos correspondiente al % área de los picos del análisis de T-RFLP

Cultivar: 1-El Paso; 2-Tacuarí / Fecha: 1-A; 2-B; 3-C; 4-D / Manejo Hídrico: 1- Drenado; 2- No Drenado

NOTA: las columnas en turquesa corresponden a las OTUs ocasionales y los recuadros violetas a las OTUs más abundantes dstandándose los valores mayores al 50%

Muestra	Cultivar	Fecha	Manejo Hídrico	133	143	210	229	232	263	267	289	305	316	319	326	328	345	350	368	390	398	414	420	434	442	571	581	610	621	630	633	
A	E2a	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	4,3	0	0	0	2,8	0	0	10	0	0	0	53	0	0	0	0	0	0	0	0	26
	E4a	1	1	1	13	0	0	0	0	0	0	8,9	0	0	0	5	0	0	21	0	0	0	37	0	0	0	0	0	0	0	0	15
	E7a	1	1	1	5,6	0	0	0	2,9	0	1,3	0	6,6	0	0	0	0	0	19	0	0	0	42	0	0	0	0	0	0	0	0	22
	E1a	1	1	2	2,3	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0	0	2,5	0	0	14	0	0	0	56	0	0	0	0	0	0	0	23
	E3a	1	1	2	3,2	0	0	0	0	0	0	0	5,6	0	0	0	3,3	0	0	21	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	17
	E5a	1	1	2	2,5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	1,6	0	0	32	0	0	0	43	0	0	0	0	0	0	0	16
	T3a	2	1	1	1,1	0	0	0	0	0	0	0	1,3	0	0	0	1,8	0	0	48	0	0	0	36	0	0	0	0	0	0	0	11
	T5a	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	76	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	10
	T7a	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1,8	0	0	65	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	6
	T2a	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,6	1,6	0	60	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	8,6
	T8a	2	1	2	3,8	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	0	0	6,5	0	0	3,5	0	0	0	64	0	0	0	0	0	0	0	20
T1a	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	0	6,4	0	0	0	66	0	0	0	0	0	0	0	25	
B	E7b	1	2	1	3,1	1,6	0	0	0	0	0	2,6	0	2,6	0	1,3	0	0	2,8	0	3,4	0	38	0	2,8	0	0	0	0	0	42	
	E2b	1	2	1	1,5	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	1,1	0	17	27	0	6,4	0	23	0	5,3	0	0	0	0	0	18	
	E4b	1	2	1	2,5	0	1,1	0	0	0	0	2,7	0	0	0	2,5	0	0	3	0	5,4	0	37	0	2,8	0	0	0	0	0	43	
	E5b	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	15	0	2,6	0	41	0	20	0	0	0	0	0	19	
	E1b	1	2	2	3,2	0	0	0	0	0	0	0	3,1	0	0	0	4,6	0	0	8	2,5	3,4	0	37	0	4,6	0	0	0	0	34	
	E3b	1	2	2	1,2	0	0	0	0	0	0	0	2,7	0	0	0	3	0	0	1,9	0	1,5	0	36	0	3	0	0	0	0	51	
	T3b	2	2	1	3,6	0	0	0	0	0	0	0	1,6	0	0	0	1,4	0	3,3	29	0	2,4	0	32	0	8,4	0	0	0	0	19	
	T5b	2	2	1	1,1	0	0	0	0	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0	23	29	0	8,8	0	21	0	6,2	0	0	0	0	10	
	T7b	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	0	0	0	1,2	0	0	41	0	0	0	36	0	5,3	0	0	0	0	15	
	T1b	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,7	46	0	2,7	0	23	0	9,8	0	0	0	0	10	
T2b	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	38	0	2,5	0	33	0	9,7	0	0	0	0	13		
T8b	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	43	0	4,2	0	28	0	7,8	0	0	0	0	5,7		
C	E4c	1	3	1	1,9	0	0	0	0	0	0	1,9	0	0	0	2,7	0	7,7	28	0	5,7	0	30	0	7,3	0	0	0	0	6,2	9,3	
	E7c	1	3	1	1,6	0	0	0	0	0	0	3,3	0	0	0	2,7	0	16	25	0	9,2	0	26	0	4,4	0	0	0	0	0	12	
	E2c	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1,9	0	0	0	1,2	0	19	33	0	6,7	0	25	0	3,6	0	0	0	0	0	9,1	
	E5c	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	3,9	0	0	0	6,7	0	0	2,4	2	15	0	48	0	0	0	0	0	0	11	11	
	E1c	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	1,9	0	0	0	4,5	0	2,6	13	1,1	11	0	35	0	6,5	0	0	0	0	0	24	
	E3c	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	22	0	5	0	45	0	6,3	0	0	0	0	0	17	
	T3c	2	3	1	19	0	0	0	0	0	0	9,4	0	0	0	12	0	0	5,6	0	0	0	34	0	3,2	0	0	0	0	0	17	
	T5c	2	3	1	7,4	0	0	3,8	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	34	0	0	0	23	0	1	0	0	0	0	0	14	
	T7c	2	3	1	6,9	0	0	6,2	0	0	0	8,5	0	0	0	1,1	0	0	40	0	0	0	24	0	1,3	0	0	0	0	0	13	
	T2c	2	3	2	8,7	0	0	1,1	0	0	0	6	0	0	0	3,4	0	0	8	0	0	0	52	0	2,3	0	0	0	0	0	18	
	T8c	2	3	2	1,9	0	0	0	0	1,5	0	1,2	8,4	1,5	0	0	1,1	0	0	11	0	0	0	48	0	0	0	0	0	0	0	25
T1c	2	3	2	15	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	2	0	0	31	0	0	1,2	27	0	0	0	0	0	0	0	11		
D	E4d	1	4	1	1,2	0	0	0	0	0	0	3,5	0	0	0	2,6	0	0	2,1	0	6,5	0	40	1	2,6	0	0	1,3	0	0	39	
	E7d	1	4	1	4	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	3,9	0	0	4,5	0	1,9	0	35	0	3,5	0	0	0	0	0	38	
	E2d	1	4	1	1	0	0	0	0	0	0	3,4	0	0	0	2,4	0	9,6	19	0	11	0	29	0	6,1	0	0	0	0	0	19	
	E5d	1	4	2	0	0	0	0	0	0	0	3,6	0	0	0	3	0	0	4,6	0	6,4	0	39	1,1	4,9	0	0	0	1,7	0	35	
	E1d	1	4	2	0	0	0	0	0	0	0	4,4	0	0	0	5,1	0	0	8,8	2,5	9	0	39	0	4,1	0	0	0	1,2	0	26	
	E3d	1	4	2	0	0	0	0	0	0	0	4,3	0	0	0	2,8	0	0	0	1,4	11	0	39	1,3	1,1	0	0	1,1	0	0	38	
	T3d	2	4	1	4,7	0	0	0	0	0	0	9,7	0	0	0	4,4	0	0	0	16	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	5,3	
	T5d	2	4	1	7,4	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	3	0	0	13	3,4	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	11	
	T7d	2	4	1	1,2	0	0	0	0	0	0	2,2	0	0	0	4,7	6,5	0	39	5,9	0	0	31	0	0	0	2,3	0	0	0	6,5	
	T8d	2	4	2	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	3,1	3,6	0	33	4,5	0	0	33	0	0	3,1	0	0	0	0	6,9	
T1d	2	4	2	0	0	0	0	0	0	0	7,1	0	0	0	1,4	0	0	49	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0	16		
T2d	2	4	2	1,6	0	0	0	0	0	0	5,7	0	0	0	4,4	0	0	21	0	0	0	45	0	0	0	0	0	0	0	23		

❖ 5) BLAST realizado para los 21 clones de la biblioteca génica
(Nucleotide BLAST / Nucleotide collection)

H1_pJET1_2R						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Uncultured crenarchaeote clone ZS_51C7 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1112	1112	98%	0.0	99%	FJ601607.1
Uncultured crenarchaeote clone MS_10B2 ammonia monooxygenase subunit A-like (amoA) gene, partial sequence	1109	1109	98%	0.0	99%	FJ601550.1
Uncultured crenarchaeote clone MS_13E2 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1059	1059	98%	0.0	97%	FJ601552.1
Uncultured crenarchaeote clone MS_3C1 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1053	1053	98%	0.0	97%	FJ601565.1
Uncultured crenarchaeote clone LSTE-AOA32 AmoA (amoA) gene, partial cds	1051	1051	100%	0.0	97%	KC773907.1
Uncultured crenarchaeote clone sagar550 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1007	1007	97%	0.0	96%	JN190854.1
Uncultured crenarchaeote clone sagar551 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1003	1003	97%	0.0	96%	JN190855.1
Uncultured crenarchaeote clone sagar549 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	989	989	96%	0.0	96%	JN190853.1
Uncultured crenarchaeote clone sagar548 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	983	983	97%	0.0	95%	JN190852.1
Uncultured crenarchaeote isolate DGGE gel gel band A11 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	972	972	93%	0.0	96%	EU315734.1

H2_pJET1_2R						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Uncultured archaeon clone A0351 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1157	1157	99%	0.0	99%	JN179661.1
Uncultured archaeon clone A2807 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1140	1140	99%	0.0	99%	JN179662.1
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band H ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1131	1131	99%	0.0	99%	JQ406898.1
Uncultured archaeon clone A2827 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1118	1118	99%	0.0	99%	JN179669.1
Uncultured archaeon clone A11302 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1107	1107	99%	0.0	98%	JN179638.1
Uncultured archaeon clone AOA-804-205-22 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1103	1103	98%	0.0	98%	KC293281.1
Uncultured archaeon clone AOA-834-205-29 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1103	1103	98%	0.0	98%	KC293239.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R75 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1098	1098	99%	0.0	98%	HM047260.1
Uncultured crenarchaeote clone S19-E6 ammonium monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1096	1096	99%	0.0	98%	HQ340405.1
Uncultured crenarchaeote amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, partial cds, isolate: DGGE band:B6-4	1096	1096	100%	0.0	98%	AB545941.1

H3_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured crenarchaeote clone 10 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1160	1160	99%	0.0	99%	DQ304871.1	
Uncultured crenarchaeote clone QY-A41 ammonia monoxygenase (amoA) gene, partial cds	1138	1138	99%	0.0	99%	EF207217.1	
Uncultured crenarchaeote clone sA0-3-6 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1133	1133	99%	0.0	99%	JQ320509.1	
Uncultured crenarchaeote partial amoA gene for ammonia monoxygenase subunit A, clone AOA_C16	1123	1123	99%	0.0	99%	FN869061.1	
Uncultured archaeon clone DY_25 ammonia monoxygenase subunit A gene, partial cds	1096	1096	97%	0.0	99%	GQ911245.1	
Uncultured archaeon clone 18C_26 ammonia monoxygenase alpha subunit (amoA) gene, partial cds	1079	1079	100%	0.0	97%	JQ404256.1	
Uncultured archaeon clone 18C_1 ammonia monoxygenase alpha subunit (amoA) gene, partial cds	1068	1068	100%	0.0	97%	JQ403814.1	
Uncultured archaeon clone DY_8 ammonia monoxygenase subunit A gene, partial cds	1057	1057	99%	0.0	97%	GQ911229.1	
Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone QA62 ammonia monoxygenase (amoA) gene, partial cds	1053	1053	93%	0.0	99%	JF900664.1	
Uncultured thaumarchaeote clone Till_AOA-T7-D8 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1026	1026	99%	0.0	96%	JQ638799.1	

H4_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured crenarchaeote clone 10 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1166	1166	99%	0.0	99%	DQ304871.1	
Uncultured crenarchaeote clone QY-A41 ammonia monoxygenase (amoA) gene, partial cds	1146	1146	100%	0.0	99%	EF207217.1	
Uncultured crenarchaeote clone sA0-3-6 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1140	1140	100%	0.0	99%	JQ320509.1	
Uncultured crenarchaeote partial amoA gene for ammonia monoxygenase subunit A, clone AOA_C16	1129	1129	99%	0.0	99%	FN869061.1	
Uncultured archaeon clone DY_25 ammonia monoxygenase subunit A gene, partial cds	1101	1101	97%	0.0	99%	GQ911245.1	
Uncultured archaeon clone 18C_26 ammonia monoxygenase alpha subunit (amoA) gene, partial cds	1083	1083	99%	0.0	97%	JQ404256.1	
Uncultured archaeon clone 18C_1 ammonia monoxygenase alpha subunit (amoA) gene, partial cds	1072	1072	99%	0.0	97%	JQ403814.1	
Uncultured archaeon clone DY_8 ammonia monoxygenase subunit A gene, partial cds	1061	1061	99%	0.0	97%	GQ911229.1	
Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone QA62 ammonia monoxygenase (amoA) gene, partial cds	1059	1059	93%	0.0	99%	JF900664.1	
Uncultured thaumarchaeote clone Till_AOA-T7-D8 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1031	1031	99%	0.0	96%	JQ638799.1	

H5_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured archaeon clone A0351 ammonia monoxygenase (amoA) gene, partial cds	1157	1157	99%	0.0	99%	JN179661.1	
Uncultured archaeon clone A2807 ammonia monoxygenase (amoA) gene, partial cds	1140	1140	99%	0.0	99%	JN179662.1	
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band H ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1131	1131	99%	0.0	99%	JQ406898.1	
Uncultured archaeon clone A2827 ammonia monoxygenase (amoA) gene, partial cds	1118	1118	99%	0.0	99%	JN179669.1	
Uncultured archaeon clone A11302 ammonia monoxygenase (amoA) gene, partial cds	1107	1107	99%	0.0	98%	JN179638.1	
Uncultured archaeon clone AOA-804-205-22 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1103	1103	98%	0.0	98%	KC293281.1	
Uncultured archaeon clone AOA-834-205-29 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1103	1103	98%	0.0	98%	KC293239.1	
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R75 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1098	1098	99%	0.0	98%	HM047260.1	
Uncultured crenarchaeote clone S19-E6 ammonium monoxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1096	1096	99%	0.0	98%	HQ340405.1	
Uncultured crenarchaeote amoA gene for ammonia monoxygenase subunit A, partial cds, isolate: DGGE band:B6-4	1096	1096	100%	0.0	98%	AB545941.1	

H6_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured archaeon clone A1-72 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1133	1133	99%	0.0	99%	JQ750206.1	
Uncultured archaeon clone A0907 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1129	1129	99%	0.0	99%	JN180067.1	
Uncultured archaeon clone A0324 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1129	1129	99%	0.0	99%	JN180062.1	
Uncultured archaeon clone A0348 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1123	1123	99%	0.0	99%	JN180064.1	
Uncultured archaeon clone A0339 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1123	1123	99%	0.0	99%	JN180063.1	
Uncultured archaeon clone A8225 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1118	1118	99%	0.0	99%	JN180065.1	
Uncultured archaeon clone E1-50 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1116	1116	99%	0.0	98%	JQ750256.1	
Uncultured crenarchaeote clone SF_CB20_26 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1114	1114	95%	0.0	99%	DQ148678.1	
Uncultured archaeon clone A1-74 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	100%	0.0	98%	JQ750207.1	
Uncultured archaeon clone A1422 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	99%	0.0	98%	JN180066.1	

H7_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured archaeon clone A0351 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1151	1151	99%	0.0	99%	JN179661.1	
Uncultured archaeon clone A2807 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1134	1134	99%	0.0	99%	JN179662.1	
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band H ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1125	1125	99%	0.0	99%	JQ406898.1	
Uncultured archaeon clone A2827 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	99%	0.0	98%	JN179669.1	
Uncultured archaeon clone A11302 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1101	1101	99%	0.0	98%	JN179638.1	
Uncultured archaeon clone AOA-804-205-22 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1098	1098	98%	0.0	98%	KC293281.1	
Uncultured archaeon clone AOA-834-205-29 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1098	1098	98%	0.0	98%	KC293239.1	
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R75 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1092	1092	99%	0.0	98%	HM047260.1	
Uncultured crenarchaeote clone S19-E6 ammonium monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1090	1090	99%	0.0	98%	HQ340405.1	
Uncultured crenarchaeote amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, partial cds, isolate: DGGE band: B6-4	1090	1090	100%	0.0	98%	AB545941.1	

H8_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured archaeon clone A0351 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1146	1146	99%	0.0	99%	JN179661.1	
Uncultured archaeon clone A2807 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1129	1129	99%	0.0	99%	JN179662.1	
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band H ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1120	1120	99%	0.0	99%	JQ406898.1	
Uncultured archaeon clone A2827 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1118	1118	99%	0.0	99%	JN179669.1	
Uncultured archaeon clone A11302 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1107	1107	99%	0.0	98%	JN179638.1	
Uncultured archaeon clone AOA-804-205-22 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1092	1092	98%	0.0	98%	KC293281.1	
Uncultured archaeon clone AOA-834-205-29 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1092	1092	98%	0.0	98%	KC293239.1	
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R75 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1086	1086	99%	0.0	98%	HM047260.1	
Uncultured archaeon clone A7636 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1085	1085	99%	0.0	98%	JN179670.1	
Uncultured crenarchaeote clone S19-E6 ammonium monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1085	1085	99%	0.0	98%	HQ340405.1	

H9_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured archaeon clone A0351 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1157	1157	99%	0.0	99%	JN179661.1	
Uncultured archaeon clone A2807 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1140	1140	99%	0.0	99%	JN179662.1	
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band H ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1131	1131	99%	0.0	99%	JQ406898.1	
Uncultured archaeon clone A2827 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1118	1118	99%	0.0	99%	JN179669.1	
Uncultured archaeon clone A11302 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1107	1107	99%	0.0	98%	JN179638.1	
Uncultured archaeon clone AOA-804-205-22 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1103	1103	98%	0.0	98%	KC293281.1	
Uncultured archaeon clone AOA-834-205-29 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1103	1103	98%	0.0	98%	KC293239.1	
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R75 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1098	1098	99%	0.0	98%	HM047260.1	
Uncultured crenarchaeote clone S19-E6 ammonium monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1096	1096	99%	0.0	98%	HQ340405.1	
Uncultured crenarchaeote clone S19-E2 ammonium monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1094	1094	99%	0.0	98%	HQ340414.1	

H10_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-15 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1059	1059	99%	0.0	97%	HM754670.1	
Uncultured crenarchaeote clone sA12-14 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1057	1057	100%	0.0	97%	JQ320517.1	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-17 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1053	1053	99%	0.0	97%	HM754672.1	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-8 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1053	1053	99%	0.0	97%	HM754663.1	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-12 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1048	1048	99%	0.0	97%	HM754667.1	
Uncultured archaeon clone A4033 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1046	1046	99%	0.0	97%	JN179935.1	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-43 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1037	1037	99%	0.0	96%	HM754698.1	
Uncultured archaeon clone A6441 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1024	1024	99%	0.0	96%	JN179936.1	
Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone SA20 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	987	987	93%	0.0	97%	JF900673.1	
Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone A9 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	946	946	100%	0.0	94%	KC200010.1	

H11_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured archaeon clone A1-72 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1129	1129	100%	0.0	99%	JQ750206.1	
Uncultured archaeon clone A0907 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1129	1129	100%	0.0	99%	JN180067.1	
Uncultured archaeon clone A0324 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1129	1129	100%	0.0	99%	JN180062.1	
Uncultured archaeon clone A0348 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1123	1123	100%	0.0	99%	JN180064.1	
Uncultured archaeon clone A0339 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1123	1123	100%	0.0	99%	JN180063.1	
Uncultured archaeon clone A8225 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1118	1118	100%	0.0	99%	JN180065.1	
Uncultured crenarchaeote clone SF_CB20_26 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1114	1114	95%	0.0	99%	DQ148678.1	
Uncultured archaeon clone E1-50 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	100%	0.0	98%	JQ750256.1	
Uncultured archaeon clone A1422 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	100%	0.0	98%	JN180066.1	
Uncultured crenarchaeote clone SF_CB20_23 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1109	1109	95%	0.0	99%	DQ148675.1	

H14_pJET1_2R

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Uncultured archaeon clone A0351 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1151	1151	99%	0.0	99%	JN179661.1
Uncultured archaeon clone A2807 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1134	1134	99%	0.0	99%	JN179662.1
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band H ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1125	1125	99%	0.0	99%	JQ406898.1
Uncultured archaeon clone A2827 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	99%	0.0	98%	JN179669.1
Uncultured archaeon clone A11302 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1101	1101	99%	0.0	98%	JN179638.1
Uncultured archaeon clone AOA-804-205-22 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1098	1098	98%	0.0	98%	KC293281.1
Uncultured archaeon clone AOA-834-205-29 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1098	1098	98%	0.0	98%	KC293239.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R75 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1092	1092	99%	0.0	98%	HM047260.1
Uncultured crenarchaeote clone S19-E6 ammonium monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1090	1090	99%	0.0	98%	HQ340405.1
Uncultured crenarchaeote amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, partial cds, isolate: DGGE band:B6-4	1090	1090	100%	0.0	98%	AB545941.1

H15_pJET1_2R

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Uncultured archaeon clone A0351 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1162	1162	99%	0.0	99%	JN179661.1
Uncultured archaeon clone A2807 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1134	1134	99%	0.0	99%	JN179662.1
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band H ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1131	1131	99%	0.0	99%	JQ406898.1
Uncultured archaeon clone A2827 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	99%	0.0	98%	JN179669.1
Uncultured archaeon clone A11302 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	99%	0.0	98%	JN179638.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R75 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1103	1103	99%	0.0	98%	HM047260.1
Uncultured crenarchaeote amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, partial cds, isolate: DGGE band:B6-4	1101	1101	100%	0.0	98%	AB545941.1
Uncultured archaeon clone AOA-804-205-22 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1098	1098	98%	0.0	98%	KC293281.1
Uncultured archaeon clone AOA-834-205-29 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1098	1098	98%	0.0	98%	KC293239.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-G1 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1096	1096	99%	0.0	98%	HQ896063.1

H16_pJET1_2R

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Uncultured crenarchaeote clone QY-A49 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1157	1157	100%	0.0	99%	EF207225.1
Uncultured archaeon clone w24 ammonium monooxygenase alpha subunit (amoA) gene, partial cds	1138	1138	99%	0.0	99%	GU396254.1
Uncultured archaeon clone A11820 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1134	1134	99%	0.0	99%	JN180037.1
Uncultured archaeon clone A2817 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1134	1134	99%	0.0	99%	JN180036.1
Uncultured archaeon clone A2803 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1134	1134	99%	0.0	99%	JN180035.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-F86 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1134	1134	99%	0.0	99%	HQ896046.1
Uncultured archaeon clone 46#5 ammonium monooxygenase alpha subunit (amoA) gene, partial cds	1131	1131	99%	0.0	99%	GU396249.1
Uncultured crenarchaeote clone lj-aoa1 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1123	1123	99%	0.0	99%	KJ081661.1
Uncultured archaeon clone A2826 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1123	1123	99%	0.0	99%	JN180041.1
Uncultured archaeon clone A8210 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1123	1123	99%	0.0	99%	JN180040.1

H17_pJET1_2R

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone TH0106174_17-24_M13F(-47) ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1173	1173	100%	0.0	100%	JQ864679.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R16 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1171	1171	99%	0.0	100%	FJ517349.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R19 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1171	1171	99%	0.0	100%	FJ517350.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R78 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1170	1170	99%	0.0	100%	HM047262.1
Uncultured archaeon clone A2805 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1168	1168	99%	0.0	100%	JN179681.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R91 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1168	1168	99%	0.0	100%	HM047254.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R2 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1168	1168	99%	0.0	100%	FJ517344.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R103 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1166	1166	99%	0.0	99%	HM047244.1
Uncultured archaeon clone 43#30 ammonium monooxygenase alpha subunit (amoA) gene, partial cds	1166	1166	99%	0.0	99%	GU396246.1
Uncultured crenarchaeote clone AOA-R12 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1166	1166	99%	0.0	99%	FJ517347.1

H18_pJET1_2R

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Uncultured crenarchaeote clone 10 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1166	1166	99%	0.0	99%	DQ304871.1
Uncultured crenarchaeote clone QY-A41 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1144	1144	99%	0.0	99%	EF207217.1
Uncultured crenarchaeote clone sA0-3-6 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1138	1138	99%	0.0	99%	JQ320509.1
Uncultured crenarchaeote partial amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, clone AOA_C16	1129	1129	99%	0.0	99%	FN869061.1
Uncultured archaeon clone DY_25 ammonia monooxygenase subunit A gene, partial cds	1101	1101	97%	0.0	99%	GQ911245.1
Uncultured archaeon clone 18C_26 ammonia monooxygenase alpha subunit (amoA) gene, partial cds	1085	1085	100%	0.0	97%	JQ404256.1
Uncultured archaeon clone 18C_1 ammonia monooxygenase alpha subunit (amoA) gene, partial cds	1074	1074	100%	0.0	97%	JQ403814.1
Uncultured archaeon clone DY_8 ammonia monooxygenase subunit A gene, partial cds	1062	1062	99%	0.0	97%	GQ911229.1
Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone QA62 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1059	1059	93%	0.0	99%	JF900664.1
Uncultured thaumarchaeote clone Till_AOA-T7-D8 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1031	1031	99%	0.0	96%	JQ638799.1

H19_pJET1_2R

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Uncultured archaeon clone A12109 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1107	1107	99%	0.0	98%	JN180023.1
Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone TH0106161_17-11_M13F(-47) ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1105	1105	99%	0.0	98%	JQ864667.1
Uncultured crenarchaeote clone FS-2 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1101	1101	99%	0.0	98%	JQ972030.1
Uncultured archaeon clone CAT-39 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1090	1090	97%	0.0	99%	GQ481086.1
Uncultured archaeon clone CAT-6 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1090	1090	97%	0.0	99%	GQ481085.1
Uncultured crenarchaeote clone 3043-A-33 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1090	1090	100%	0.0	98%	EU885578.1
Uncultured crenarchaeote clone W-E3 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1085	1085	99%	0.0	98%	JF936046.1
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band J ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1070	1070	99%	0.0	97%	JQ406900.1
Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-27 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1066	1066	99%	0.0	97%	EU885696.1
Uncultured archaeon clone A7630 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1057	1057	99%	0.0	97%	JN180021.1

H20_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured archaeon clone A1-70 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1101	1101	100%	0.0	98%	JQ750204.1	
Uncultured archaeon clone A1-18 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1101	1101	100%	0.0	98%	JQ750163.1	
Uncultured crenarchaeote partial amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, clone AOA-90	1099	1099	99%	0.0	98%	FN562528.1	
Uncultured crenarchaeote partial amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, clone AOA-73	1099	1099	99%	0.0	98%	FN562515.1	
Uncultured archaeon clone ES-Core-SR2-sG08 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1096	1096	94%	0.0	99%	HM363974.1	
Uncultured crenarchaeote partial amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, clone AOA-68	1096	1096	100%	0.0	98%	FN562512.1	
Uncultured crenarchaeote partial amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, clone AOA-107	1096	1096	100%	0.0	98%	FN562504.1	
Uncultured crenarchaeote partial amoA gene for ammonia monooxygenase subunit A, clone AOA-67	1094	1094	99%	0.0	98%	FN562511.1	
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band P-5(PS-2) ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1090	1090	99%	0.0	98%	KC568416.1	
Uncultured archaeon isolate DGGE gel band P-2 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1090	1090	99%	0.0	98%	KC568413.1	

H22_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured crenarchaeote clone ZS_51C7 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1101	1101	98%	0.0	98%	FJ601607.1	
Uncultured crenarchaeote clone MS_10B2 ammonia monooxygenase subunit A-like (amoA) gene, partial sequence	1098	1098	98%	0.0	98%	FJ601550.1	
Uncultured crenarchaeote clone MS_13E2 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1048	1048	98%	0.0	97%	FJ601552.1	
Uncultured crenarchaeote clone MS_3C1 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1042	1042	98%	0.0	97%	FJ601565.1	
Uncultured crenarchaeote clone LSTE-AOA32 AmoA (amoA) gene, partial cds	1040	1040	100%	0.0	96%	KC773907.1	
Uncultured crenarchaeote clone sagar550 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	996	996	97%	0.0	96%	JN190854.1	
Uncultured crenarchaeote clone sagar551 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	992	992	97%	0.0	96%	JN190855.1	
Uncultured crenarchaeote clone sagar549 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	977	977	96%	0.0	96%	JN190853.1	
Uncultured crenarchaeote clone sagar548 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	972	972	97%	0.0	95%	JN190852.1	
Uncultured crenarchaeote isolate DGGE gel gel band A11 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	961	961	93%	0.0	96%	EU315734.1	

H25_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-15 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1053	1053	99%	0.0	97%	HM754670.1	
Uncultured crenarchaeote clone sA12-1-4 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1050	1050	99%	0.0	97%	JQ320517.1	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-17 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1048	1048	99%	0.0	97%	HM754672.1	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-8 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1048	1048	99%	0.0	97%	HM754663.1	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-12 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1042	1042	99%	0.0	97%	HM754667.1	
Uncultured archaeon clone A4033 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1040	1040	99%	0.0	96%	JN179935.1	
Uncultured crenarchaeote clone E-NOV-43 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1031	1031	99%	0.0	96%	HM754698.1	
Uncultured archaeon clone A6441 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1018	1018	99%	0.0	96%	JN179936.1	
Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone SA20 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	981	981	93%	0.0	97%	JF900673.1	
Uncultured crenarchaeote clone sA12-1-2 ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	941	941	100%	0.0	93%	JQ320516.1	

H26_pJET1_2R							
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession	
Uncultured archaeon clone A1-72 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1123	1123	100%	0.0	99%	JQ750206.1	
Uncultured archaeon clone A0907 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1118	1118	99%	0.0	99%	JN180067.1	
Uncultured archaeon clone A0324 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1118	1118	99%	0.0	99%	JN180062.1	
Uncultured archaeon clone A0348 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	99%	0.0	98%	JN180064.1	
Uncultured archaeon clone A0339 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1112	1112	99%	0.0	98%	JN180063.1	
Uncultured archaeon clone E1-50 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1107	1107	100%	0.0	98%	JQ750256.1	
Uncultured archaeon clone A8225 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1107	1107	99%	0.0	98%	JN180065.1	
Uncultured crenarchaeote clone SF_CB20_26 putative ammonia monooxygenase subunit A (amoA) gene, partial cds	1103	1103	95%	0.0	99%	DQ148678.1	
Uncultured archaeon clone A1422 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1101	1101	99%	0.0	98%	JN180066.1	
Uncultured archaeon clone A1-74 ammonia monooxygenase (amoA) gene, partial cds	1099	1099	99%	0.0	98%	JQ750207.1	

❖ 6) BLAST realizado para los 21 clones de la biblioteca génica
(Nucleotide BLAST / Reference Genomic Sequences)

H1_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	457	457	99%	0,0	80%	NC_018719.1
Candidatus Nitrosopumilus sp. AR2 chromosome, complete genome	243	243	99%	0,0	74%	NC_018656.1
Candidatus Nitrosopumilus koreensis AR1 chromosome, complete genome	187	187	99%	0,0	72%	NC_018655.1
Nitrosopumilus maritimus SCM1 chromosome, complete genome	182	182	99%	0,0	72%	NC_010085.1
H2_pJET1_2R						
Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 chromosome, whole genome shotgun sequence	479	479	99%	0,0	80%	NZ_CM001158.1
H3_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	673	673	99%	0,0	86%	NC_018719.1
H4_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	673	673	99%	0,0	86%	NC_018719.1
H5_pJET1_2R						
Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 chromosome, whole genome shotgun sequence	479	479	99%	0,00	80%	NZ_CM001158.1
H6_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	418	418	99%	0,00	79%	NC_018719.1
H7_pJET1_2R						
Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 chromosome, whole genome shotgun sequence	473	473	99%	5,0E-129	80%	NZ_CM001158.1
H8_pJET1_2R						
Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 chromosome, whole genome shotgun sequence	484	484	99%	0,00	80%	NZ_CM001158.1
H9_pJET1_2R						
Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 chromosome, whole genome shotgun sequence	479	479	99%	0,00	80%	NZ_CM001158.1
H10_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	640	640	99%	5,0E-179	85%	NC_018719.1
H11_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	414	414	100%	3,0E-111	79%	NC_018719.1
H14_pJET1_2R						
Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 chromosome, whole genome shotgun sequence	473	473	99%	5,0E-129	80%	NZ_CM001158.1
H15_pJET1_2R						
Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 chromosome, whole genome shotgun sequence	473	473	99%	5,0E-129	80%	NZ_CM001158.1
H16_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	418	418	99%	2,0E-112	79%	NC_018719.1
H17_pJET1_2R						
Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 chromosome, whole genome shotgun sequence	451	451	99%	2,0E-122	80%	NZ_CM001158.1
H18_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	673	673	99%	0,0	86%	NC_018719.1
H19_pJET1_2R						
Nitrosopumilus maritimus SCM1 chromosome, complete genome	204	204	99%	7,0E-48	73%	NC_010085.1
Candidatus Nitrosopumilus koreensis AR1 chromosome, complete genome	182	182	99%	4,0E-41	72%	NC_018655.1
H20_pJET1_2R						
Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 chromosome, whole genome shotgun sequence	302	302	99%	3,0E-77	76%	NZ_CM001158.1
H22_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	446	446	99%	1,0E-120	79%	NC_018719.1
Candidatus Nitrosopumilus sp. AR2 chromosome, complete genome	237	237	99%	7,0E-58	74%	NC_018656.1
Candidatus Nitrosopumilus koreensis AR1 chromosome, complete genome	182	182	99%	4,0E-41	72%	NC_018655.1
Nitrosopumilus maritimus SCM1 chromosome, complete genome	176	176	99%	2,0E-39	72%	NC_010085.1
H25_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	634	634	99%	2,0E-177	85%	NC_018719.1
H26_pJET1_2R						
Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2 chromosome, complete genome	407	407	99%	5,0E-109	78%	NC_018719.1

❖ 7) Soluciones utilizadas para la realización de Minipreps

Solución I (almacenar a 4°C)		Solución II (realizar en el momento)		Solución III	
Glucosa	50 mM	NaOH	0.2 N	Acetato de potasio	3M
EDTA (pH=8)	10mM	SDS	1%	Ácido acético glacial	5M
Tris.Cl (ph=8)	25mM				

Buffer TE (pH=8)	
Tris.Cl (pH=8)	10mM
EDTA (pH=8)	1mM

Montevideo, Junio de 2014