



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**DIVERSIDAD MICROBIANA RIZOSFÉRICA DEL BOFEDAL DE PUMACOCHA
(ANCASH, PERÚ) MEDIANTE ANÁLISIS DE METABARCODING**

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Valdeiglesias Ichillumpa, Stefhany

Asesor interno:

Nolasco Cardenas, Oscar Patricio (ORCID: 0000-0002-5672-5516)

Asesores externos:

Calderón Ríos, Martha Steffany (ORCID: 0000-0003-3611-140X)

Bustamante Mostajo, Danilo Edson (ORCID: 0000-0002-5979-6993)

Jurado:

Iannacone Oliver, José Alberto

Riveros Ramirez, Maribel Denise

Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima - Perú

2023



DIVERSIDAD MICROBIANA RIZOSFÉRICA DEL BOFEDAL DE PUMACOCHA (ANCASH, PERÚ) MEDIANTE ANÁLISIS DE METABARCODING

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%

INDICE DE SIMILITUD

5%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%
3	repositorio.untrm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
4	1library.co Fuente de Internet	<1%
5	www.jove.com Fuente de Internet	<1%
6	www.ognorhynchus.com Fuente de Internet	<1%
7	horizon.documentation.ird.fr Fuente de Internet	<1%
8	Submitted to Buckinghamshire Chilterns University College Trabajo del estudiante	<1%



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**DIVERSIDAD MICROBIANA RIZOSFÉRICA DEL BOFEDAL DE
PUMACOCHA (ANCASH, PERÚ) MEDIANTE ANÁLISIS DE METABARCODING**

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Valdeiglesias Ichillumpa, Stefhany

Asesor interno:

Nolasco Cardenas, Oscar Patricio

(ORCID: 0000-0002-5672-5516)

Asesores externos:

Calderón Ríos, Martha Steffany

(ORCID: 0000-0003-3611-140X)

Bustamante Mostajo, Danilo Edson

(ORCID: 0000-0002-5979-6993)

Jurado:

Iannacone Oliver, José Alberto

Riveros Ramirez, Maribel Denise

Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima – Perú

2023

DEDICATORIA

A mi mamá, quien confió en mí cuando más lo necesité.

A todos los estudiantes de ciencias, sigamos pregonando esta hermosa pasión por descubrir el potencial de los microorganismos para futuras aplicaciones en diversos sectores.

AGRADECIMIENTOS

A mis familiares, que me apoyaron y en especial a mi mamá por su apoyo incondicional ante mis intentos, aciertos y errores, por enseñarme que todo tiene solución con voluntad y esfuerzo, por recordarme que, en mis raíces, siempre encontraré la inspiración para sobreponerme.

A mis asesores externos, por haberme aceptado como tesista durante la pandemia de la COVID-19, en el área de Biología Molecular y Genómica en Amazonas - Perú; instruyéndome nuevas capacidades y aptitudes en el ámbito molecular y como profesional.

A mi asesor interno por sus comentarios y observaciones reflejando su amplio expertís en la presente tesis.

Al Proyecto Prociencia – Concytec N°035-2021 y a los encargados de la ONG Yuraq Yaqu, a cargo de la Blg. Fresia Mejía Prieto por hacer que esta investigación que deja un precedente pionero en Biotecnología de la Conservación de bofedales en Perú.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Descripción y formulación del problema	13
1.2. Antecedentes.....	14
1.3. Objetivos.....	15
1.4. Justificación	15
1.5. Hipótesis	17
II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación	18
2.1.1. <i>Humedales altoandinos o bofedales</i>	18
2.1.2. <i>Microorganismos asociados a la rizósfera de bofedales</i>	19
2.1.3. <i>Métodos de estudio de la diversidad microbiana</i>	20
III. MÉTODO	24
3.1. Tipo de investigación.....	24
3.2. Ámbito temporal y espacial	24
3.3. Variables	24
3.4. Población y muestra.....	24

3.5. Instrumentos	26
3.5.1. Instrumentos de muestreo	26
3.5.2. Instrumentos de análisis in vitro	26
3.5.3. Instrumentos de análisis in silico	27
3.6. Procedimientos	27
3.6.1. Muestreo de suelos rizosféricos de bofedales.....	28
3.6.2. Preservación de las muestras de suelos	28
3.6.3. Análisis físico – químicos de suelos	30
3.6.4. Extracción del eDNA de suelos	30
3.6.5. Cuantificación de eDNA de suelos	31
3.6.6. Amplificación y Secuenciación del DNA de suelos	32
3.6.7. Procesamiento bioinformático	33
3.7. Análisis de datos.....	34
3.8. Aspectos éticos	34
IV. RESULTADOS	37
4.1. Zonas de muestreo con impacto antropogénico	37
4.2. Predominancia de especies vegetales en las zonas de estudio.....	38
4.3. Extracción de DNA de suelos rizosféricos	39
4.4. Análisis fisicoquímicos de suelos.....	42
4.5. Análisis de la composición taxonómica	46
4.6. Análisis de diversidad microbiana.....	57

4.7. Correlación de variables fisicoquímicas y composición microbiana	59
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
VI. CONCLUSIONES	75
VII. RECOMENDACIONES	76
VIII. REFERENCIAS	77
IX. ANEXOS	101
ANEXO A. <i>Muestreo de suelos rizosféricos</i>	101
ANEXO B. <i>Análisis fisicoquímico de los suelos rizosféricos de las zonas muestreadas en el bofedal</i>	102
ANEXO C. <i>Evidencias experimentales de la extracción de DNA de suelos rizosféricos</i>	103
ANEXO D. <i>Cuantificación de DNA extraído de suelos rizosféricos mediante espectrofotometría</i>	104
ANEXO E. <i>Cuantificación de DNA extraído de suelos rizosféricos mediante fluorometría</i>	107
ANEXO F. <i>Control de calidad de la data cruda post-secuenciamiento Illumina Miseq (R Studio)</i>	110
ANEXO G. <i>Ausencia de adaptadores en los archivos fastq de la data cruda obtenida post secuenciamiento (FASTQC)</i>	112
ANEXO H. <i>Construcción del modelo de error de las secuencias filtradas para designar ASV (R Studio)</i>	113
ANEXO I. <i>Cantidad de secuencias de DNA crudas y secuencias filtradas post-secuenciamiento (R Studio)</i>	115
ANEXO J. <i>Rarefacción de ASV's post-limpieza y pareamiento de las secuencias Forward y Reverse (R Studio) por muestra</i>	116

ANEXO K. 24 géneros taxonómicos a partir de losASV's más representativos del DNA de suelos de las zonas con impacto antropogénico	117
ANEXO L. 24 géneros taxonómicos a partir de losASV's más representativos del DNA de suelos de las zonas sin impacto antropogénico	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación cartográfica de las tres zonas de muestreo.....	26
Tabla 2. Identificación visual de especies vegetales presentes en las zonas de estudio.....	38
Tabla 3. Análisis de varianza ANOVA de las variables ambientales de los suelos rizosféricos.....	46
Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA de los géneros bacterianos más representativos.....	50
Tabla 5. Predominancia de microorganismos rizosféricos de las zonas no impactadas por actividad antropogénica del bofedal de Pumacocha.....	54
Tabla 6. Predominancia de microorganismos rizosféricos de las zonas impactadas por actividad antropogénica del bofedal de Pumacocha.....	55
Tabla 7. Análisis de varianza PERMANOVA de las variables ambientales.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación del bofedal de Pumacocha.....	25
Figura 2. Ubicación geográfica de las zonas muestreadas.....	29
Figura 3. Flujograma de extracción, secuenciación y análisis computacional del DNA de suelos.....	36
Figura 4. Zonas de muestreo de suelos rizosféricos del bofedal de Pumacocha (Ancash-Perú).....	37
Figura 5. Electroforesis horizontal de DNA de suelos en gel de agarosa.....	39
Figura 6. Comparación de los métodos de cuantificación de DNA de suelos.....	40
Figura 7. Lectura de absorbancias de impurezas y DNA de suelos no impactados mediante Espectrofotometría.....	41
Figura 8. Lectura de absorbancias de impurezas y DNA de suelos impactados mediante Espectrofotometría.....	42
Figura 9. Parámetros fisicoquímicos principales del suelo.....	44
Figura 10. Parámetros fisicoquímicos según tipo de suelo.....	44
Figura 11. Parámetros fisicoquímicos de cationes intercambiables del suelo.....	45
Figura 12. Distribución de la profundidad de secuenciación de las zonas de estudio.....	47
Figura 13. Prevalencia y abundancia de microorganismos a nivel de Filo.....	49
Figura 14. Abundancias relativas de ASV's en las zonas con y sin impacto antrópico a nivel de género.....	52

Figura 15. Mapa de calor de microorganismos presentes a nivel de géneros en los suelos impactados.....	53
Figura 16. Índices de diversidad alfa de cada zona con y sin impacto antropogénico.....	58
Figura 17. Índices de diversidad beta de las zonas con y sin impacto antropogénico.....	59
Figura 18. Análisis de RDA: Correlación de la composición taxonómica con variables ambientales de los suelos rizosféricos.....	64

RESUMEN

Los humedales altoandinos son ecosistemas clave que se ven afectados por el comercio insostenible de turba y el sobrelulipastoreo del ganado. Esto reduce la cobertura vegetal, el agua, la humedad de los suelos y su comunidad microbiana rizosférica. **Objetivo:** Evaluar la diversidad microbiana de los suelos rizosféricos en zonas antropogénicas impactadas (ZI) y no impactadas (ZNI) en el humedal de Pumacocha (región Ancash, Perú central). **Método:** Se extrajo DNA de los suelos rizosféricos y se realizó la secuenciación del gen 16S mediante Illumina Miseq utilizando la biblioteca de DNA True Seq. Se realizaron análisis bioinformáticos para evaluar la composición y abundancia relativa de los microorganismos. Estas variables se asociaron a las condiciones ecológicas de los suelos del humedal. **Resultados:** En la ZNI predominaron las especies vegetales *Distichia muscoides* y *Oxicloe andina*. La composición bacteriana fue significativamente diferente entre ambas zonas; donde la abundancia relativa fue mayor en la ZI (índice de Shannon = 6; índice de Simpson = 0,9; índice de Bray Curtis = 0,5). Las ZNI presentaron una mayor proporción de bacterias no identificadas (~36%). En ambas zonas predominaron bacterias restauradoras. En las ZI se identificaron bacterias patógenas (*Candidatus Xiphinematobacter* y *Pajaroellobacter*). Respecto a las condiciones ecológicas, se encontraron diferencias en materia orgánica (ZI= 17,69 %, ZNI= 40,06 %), tipo de suelo limoso (ZI= 32,17 %, ZNI= 4,17 %) y cationes de $Al^{+3}+H^{+1}$ (ZI=11,23 $Cmol^{(+)}/ Kg$, ZNI=3,37 $Cmol^{(+)}/ Kg$). **Conclusiones:** El impacto humano alteró la diversidad de las comunidades bacterianas del suelo rizosférico ácido del bofedal de Pumacocha; reflejando la posible adaptabilidad de los microorganismos en época seca. Bacterias *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Bacillus*, *Candidatus Solibacter*, *Bryobacter*, *Bradyrhizobium*, *Acidothermus* y *Nitrobacter* podrían tener potencial de reforestación en las ZI de este bofedal.

Palabras Clave: Bofedales, DNA, Metabarcoding, Microbiota, Suelos rizosféricos

ABSTRACT

High Andean wetlands are key ecosystems that are affected by unsustainable peat trade and overgrazing by livestock. This reduces vegetation cover, water, soil moisture and their rhizospheric microbial community. **Objective:** To evaluate the microbial diversity of rhizospheric soils in impacted (IZ) and non-impacted (NIZ) anthropogenic zones in the Pumacocha wetland (Ancash region, central Peru). **Method:** DNA was extracted from rhizospheric soils and 16S gene sequencing was performed by Illumina Miseq using the True Seq DNA library. Bioinformatic analyses were performed to evaluate the composition and relative abundance of microorganisms. These variables were associated with the ecological conditions of the wetland soils. **Results:** The plant species *Distichia muscoides* and *Oxycloe andina* were predominant in the ZI. The bacterial composition was similar in both zones, but they were different in quantity; where the relative abundance was higher in the ZI (Shannon index = 6, Simpson index = 0.9; Bray-Curtis index). The NIZ had a higher proportion of unidentified bacteria (~36%). Restoration bacteria predominated in both zones. Pathogenic bacteria (*Candidatus Xiphinematobacter* and *Pajaroelloellobacter*) were identified in the IZ. Regarding ecological conditions, differences were found in organic matter (ZI= 17,69 %, ZNI= 40,06 %), loamy soil type (ZI= 32,17 %, ZNI= 4,17 %) and $Al^{+3}+H^{+1}$ cations (ZI=11,3 Cmol (+)/ Kg, ZNI=3,37 Cmol (+)/ Kg). **Conclusions:** Human impact altered the diversity of bacterial communities in the acidic rhizospheric soil of the Pumacocha wetland, reflecting the possible adaptability of microorganisms in the dry season. Bacteria *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Bacillus*, *Candidatus Solibacter*, *Bryobacter*, *Bradyrhizobium*, *Acidothermus* and *Nitrobacter* could have potential for reforestation in the IZ of this wetland.

Keywords: DNA, Metabarcoding, Microbiota, Rhizospheric soils, Vegetation, Wetland

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y formulación del problema

Los humedales altoandinos o bofedales se caracterizan por presentar colchones vegetales sobre los cuerpos de agua, éstos son el suministro de agua tanto para la flora y fauna que lo habita como para las comunidades aledañas (Ministerio del Ambiente, 2015).

La degradación de los bofedales es generada por las continuas presiones o perturbaciones antrópicas y climáticas; un impacto negativo de ello a corto plazo es la pérdida de la vegetación en este ecosistema frágil, que reduce la capacidad de secuestrar el CO₂ de su entorno (Delavaux et al., 2020).

A mediano y largo plazo el impacto negativo es el desabastecimiento hídrico para las poblaciones aledañas que corren el riesgo de sufrir inundaciones. Esto se vio agudizado durante el contexto de pandemia de la COVID-19 al haber un incremento en la explotación de la turba (Onursal & Gautam, 1997; Nwankwoala, 2012; Official Site of Monroe County, 2019; Ziegler, 2020).

Actualmente, en los bofedales de Ancash – Perú existen zonas impactadas por la actividad antrópica: el pastoreo y sobrepastoreo de camélidos que sobrecargan la superficie del bofedal, la extracción ilegal de la turba (champa) predominante y el ingreso de afluentes mineros (Maldonado, 2010; Ramírez, 2011; Sociedad Peruana de Derecho Ambiental, 2018; Decreto Supremo N°-2020-MINAM; Resolución Ministerial N°019-2022-MINAM).

La microbiota rizosférica promotora de crecimiento y bioestimulante del suelo de estos colchones vegetales tienen un papel determinante en el proceso de restauración y recuperación del bofedal (Delavaux et al., 2020). Sin embargo, ante la actual problemática de la contaminación antrópica de los bofedales peruanos, el estudio del DNA microbiano de estos suelos, un tipo de biomonitoreo no invasivo; no se está dando a la fecha en el Perú.

Por ello, el presente estudio de la distribución y diversidad microbiana rizosférica presente de zonas con escasa y abundante vegetación que, entre otros factores, evidencien los impactos antrópicos en este ecosistema; proporcionará datos básicos para futuros estudios de restauración en los bofedales peruanos.

1.2. Antecedentes

La desactualización mundial sobre las descripciones colectivas de la diversidad microbiana en los humedales motivó a Lv et al. (2014) a evaluar la diversidad microbiana en varios humedales a nivel global realizando un metanálisis de todas las secuencias de genes de ARNr 16S, y concluyeron que estos están dominados en gran medida por *Proteobacterias* (40%); seguido de arqueas (56%) y grupos bacterianos (45%).

Por otro lado, Mohan & Tippa (2019), mediante el uso del marcador genético 16S RNA, identificaron bacterias del suelo de humedal con capacidad para mejorar el proceso de fitorremediación en el sur de Chennai, India; los resultados arrojaron ocho especies bacterianas diferentes del filo *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*.

Respecto a estudios sobre diversidad microbiana en humedales en Latinoamérica, recientemente, Navarrete-Euan et al. (2021) compararon los microbiomas de sedimentos en humedales contaminados (abundantes en los taxa *FBP* y *Chloroflexi*) y prístinos (abundantes en filos *Planctomycetes* y *Acidobacteria*) de la costa de Yucatán (México), mediante la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA, para evaluar cómo las comunidades microbianas pueden cambiar su composición y abundancias según las perturbaciones ambientales.

Hasta la fecha, en el Perú no se han reportado estudios sobre la diversidad de la microbiota asociados a la rizósfera de bofedales; sin embargo, se rescata el estudio enfocado en la diversidad microbiana de los cuerpos de agua del bofedal Huaytire (Tacna, Perú) realizado

por Salazar-Torres et al. (2012), donde concluyeron que las diatomeas fueron el grupo de algas más abundante, representando el 95% de la abundancia total; mientras que las clorofíceas y las cianobacterias contribuyen solo con el 3% y el 2%, respectivamente.

1.3. Objetivos

Objetivo General

Determinar la diversidad microbiana rizosférica del bofedal de Pumacocha (Ancash, Perú) mediante identificación taxonómica a gran escala (metabarcoding).

Objetivos Específicos

Evaluar la diversidad de la comunidad microbiana rizosférica del bofedal de Pumacocha bajo condiciones de perturbación antrópica

Determinar los factores abióticos que influyen en la composición y abundancia de las comunidades microbianas rizosféricas del bofedal de Pumacocha.

Analizar el potencial de las comunidades microbianas rizosféricas para la implementación de futuros programas de restauración ecológica en bofedales.

1.4. Justificación

La principal importancia de los bofedales recae en su capacidad de secuestrar el carbono por que sirven como suministros naturales de agua para las comunidades y su destrucción agudiza el desabastecimiento hídrico y su correcta gestión (Onursal y Gautam, 1997; Nwankwoala, 2012). Además, los bofedales evitan las inundaciones almacenando temporalmente las aguas pluviales (reduciendo el flujo de agua) y estabilizando las orillas de los ríos y arroyos que colindan con éstos (Official Site of Monroe County, 2019).

La degradación de los bofedales, además, impacta negativamente a la economía de los países, causando pérdidas de miles de millones de dólares para la producción agrícola y unos

billones de dólares de coste medioambiental en todo el mundo anualmente (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2009); causando la pérdida de biodiversidad que traería consecuencias perjudiciales en el bienestar humano (Daryadel & Talaei, 2014). Esto involucra la disminución de la diversidad alimentaria provocando malnutrición, hambruna y enfermedades, especialmente en los países en desarrollo (Ipenza, 2010).

Dado que el 90% de las catástrofes están relacionadas con el agua, revertir la pérdida y degradación de los humedales puede ser parte de la solución. Por ello, a nivel mundial, muchas organizaciones no gubernamentales (ONG's) fomentan la resiliencia a lo largo de las costas fuertemente degradadas y urbanizadas que están sujetas, además, a la erosión y al hundimiento del terreno.

Esto, con el fin de dar un mayor impulso político a los servicios ecosistémicos de los humedales mediante programas de restauración, biorremediación, construcción de infraestructuras que conecten a los ecosistemas con la ingeniería o la creación de sistemas agrícolas multifuncionales que incorporen a los humedales para favorecer así la salud alimentaria (Wetlands International, 2015).

La ausencia de investigación en el Perú sobre la diversidad microbiana asociada a la rizósfera de bofedales degradados motiva a la creación del presente trabajo, puesto que este estudio sentará las bases para la elaboración de consorcios bacterianos como promotores de crecimiento vegetal, fijadores de nitrógeno y antagonistas naturales de fitopatógenos para posteriores estudios de revegetación sustentable de bofedales altoandinos peruanos. Además, este estudio busca contribuir con el Objetivo de Desarrollo Sostenible N° 15: Vida De Ecosistemas Terrestres y el N° 13: Acción Por El Clima de cara al 2030 (ONU, 2015).

Finalmente, el presente trabajo, plantea explorar la diversidad bacteriana asociada a la rizósfera del bofedal de Pumacocha – Pomabamba (Áncash, Perú) de zonas impactadas y no

impactadas por actividades antrópicas, mediante el metabarcoding de DNA, a fin de explorar la diversidad y distribución microbiana. El análisis de metabarcoding de muestras ambientales en un método rápido de evaluación de biodiversidad, rentable, auditable (verificable por otros) y que requiere menor dependencia del expertise taxonómico del investigador.

Pregunta de Investigación: ¿Cuál será la variación de la diversidad microbiana rizosférica en las zonas con impacto antropogénico del bofedal de Pumacocha, Ancash (Perú)?

1.5. Hipótesis

- ***Hipótesis nula***

Ho: No se detectarán variaciones en la diversidad microbiana rizosférica entre las zonas con y sin impacto antropogénico del bofedal de Pumacocha, Ancash (Perú)

- **Hipótesis alterna**

Ha: Se detectarán variaciones en la diversidad microbiana rizosférica entre las zonas con y sin impacto antropogénico del bofedal de Pumacocha, Ancash (Perú)

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. Humedales altoandinos o bofedales

Los bofedales o humedales altoandinos son considerados ecosistemas frágiles según la Ley General del Ambiente del Perú (Ley N.º. 28611), ya que, de éstos dependen varias especies de flora y fauna amenazadas o endémicas (León et al., 2006), cuyo hábitat se compone de turberas o capas de alta materia orgánica en estado de semi descomposición o “turba” (MINAM, 2021).

Los bofedales poseen una vegetación herbácea de tipo hidrófila, densa, compacta y vercosa de porte almohadillado, la cual, se sostiene de la diversidad microbiana rizosférica que permiten la captura del carbono y la reducción de contaminantes urbanos (Mohan & Tippa, 2019; Jackson y Pringle, 2010).

La vegetación de los bofedales está permanentemente inundados o saturados por el mal drenaje de agua corriente (MINAM, 2019), y esta alta capacidad de retención de agua provee el abastecimiento hídrico al ecosistema, siendo la principal fuente de sustento para la fauna silvestre, la ganadería y de las poblaciones aledañas (Hofstede y Aguirre, 1999; Mamani y Garcia, 2009; Resolución Presidencial N.º 257-2016-SERNANP; Suárez et al., 2016; Mango, 2017).

Cabe resaltar que, a causa de la perturbación antrópica en los bofedales, en el Perú se ha asumido el compromiso de conservarlos y promover su sostenibilidad bajo el marco de la Convención Ramsar desde 1999 (Blanco y De la Balze, 2004; MINAM, 2021).

En los valles de Llanganuco, Quilcayhuanca y Carhuascanchos en la región de Ancash, las especies más frecuentemente encontradas en los bofedales son *Calamagrostis rigescens*, *Eleocharis albibracteata*, *Gentiana sedifolia* y *Juncus ebracteatus*.

Además, estos bofedales albergan siete especies endémicas del Perú, la hierba africana invasora *Pennisetum clandestinum*, y tres especies que pueden dominar la cobertura vegetal en áreas andinas sobrepastoreadas, la especie no nativa *Trifolium amabile* (no nativa) y las especies nativas *Wernia nubigena* y *Lachemillaorbiculata* (Adler & Morales, 1999; Veblen, Young & Orme, 2007; Polk et al., 2019).

2.1.2. Microorganismos asociados a la rizósfera de bofedales

Los microorganismos principalmente asociados a la rizósfera de los bofedales están sujetos a un patrón espacial de oxígeno disponible que varía fuertemente entre las especies vegetales (Armstrong, 1978; Laan et al., 1989; Colmer, 2003). La lignina y/o suberina de las plantas actúan como una barrera para prevenir la pérdida de O₂ en la capa superior del suelo asegurando el suministro de O₂ hacia las puntas de las raíces para promover la actividad microbiana que regula el suministro de nutrientes a las plantas (Berendsen et al. 2012).

Muchos microorganismos rizosféricos de bofedales son degradadores de celobiosa, fermentadores, reductores de hierro, reductores de sulfatos, metanógenos, metanótrofos y están implicados en el reciclaje de la materia orgánica del suelo de estos humedales (Bardgett et al., 2008; Yarwood, 2018).

Parte de los microorganismos bacterianos del suelo son benéficos para el crecimiento de las plantas, ya que sintetizan fitohormonas y facilitan la absorción de nutrientes del suelo, además, ayudan a disminuir o prevenir las enfermedades de las plantas (Guo et al., 2004). Estas bacterias son generalmente denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, en inglés) (Hayat et al., 2010).

La importancia de la actividad microbiana rizosférica en los bofedales, posiblemente compuesta por proteobacterias y bacterias del género *Geobacter*, *Pseudomonas* y *Bradyrhizobium* (Zhang et al., 2021) reside en convertir el nitrógeno inorgánico en uno

asimilable por las plantas, pues retrasa o frena la degradación del medio ambiente pues influyen en el crecimiento de las plantas, la acumulación del suelo, la calidad del agua y las emisiones de gases de efecto invernadero (Reddy et al., 2010).

Desde otra perspectiva, existe un creciente interés biotecnológico en las bacterias asociadas al rizoma de *Juncus acutus* de humedales artificiales del filo Firmicutes (*Pseudomonas fluorescens*, *Microbacterium oxydans*, *Microbacterium maritypicum*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Enterobacter ludwigii*) por mostrar capacidad comercial como bioestimulantes al producir abundante ácido indolacético (IAA, en inglés), una fitohormona que promueve el crecimiento del aparato radicular (Backer et al., 2018).

Además, estos componentes microbianos actúan en la biorremediación de contaminantes orgánicos recalcitrantes (Chandra & Singh, 2014; Chandra & Singh, 2016; Chandra & Enespa, 2019); y, en reducir el estrés de la planta por presentar la enzima ACC-desaminasa encargada de catalizar el etileno de las plantas (Riva et al., 2019).

2.1.3. Métodos de estudio de la diversidad microbiana

Los estudios en diversidad microbiana asociados a la rizósfera iniciaron con estudios microbiológicos basados en la ecología microbiana de los suelos (Bull & Hardman, 1991; Bodelier & Dedysh, 2013; De Mandal & Bhatt, 2020).

Gracias a los estudios moleculares del DNA de los microorganismos basados en técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, en inglés), se comprobó que con solo se había reportado el 1% de toda la diversidad microbiana de suelo (Amann et al., 1995). Por otro lado, gracias a las técnicas de secuenciación de alto rendimiento se logró identificar, mediante la data masiva, a microorganismos no cultivables (Delmont et al., 2015).

A razón de ello, se sugiere que, para aumentar la predicción de la diversidad microbiana de suelos, se deben correlacionar resultados referenciales de la diversidad microbiana mediante, i) el aislamiento de microorganismos cultivables, ii) análisis molecular de genes diferenciales del ácido desoxirribonucleico (DNA) o el ácido ribonucleico (ARN) del grupo de microorganismos de interés y iii) datos abióticos y bióticos del lugar de estudio.

De esta manera, se espera que con el uso de herramientas bioestadísticas y bioinformáticas se muestran resultados más consistentes de la microbiota asociada a los suelos de cualquier ecosistema (Nannipieri et al., 2020) y se cuantifique la abundancia de microorganismos en respuesta a cambios de los factores ambientales (Fisher & Mehta, 2014).

Las primeras técnicas basadas en ácidos nucleicos para predecir la diversidad microbiana de la rizósfera estaban sujetas a realizar un aislamiento microbiano inicial. Sin embargo, surgió la necesidad de implementar el estudio del DNA ambiental (eDNA, en inglés) debido a la necesidad de registrar la presencia de la microbiota rara de microorganismos, poco viables de cultivar y por la limitación del aislamiento de muestras adecuados (Delavaux, 2020).

En base a ello, se propuso realizar el diagnóstico ecológico del microbioma de los suelos; es así como, en los últimos trece años se han incrementado los estudios de material genético ambiental (Taberlet et al., 2018).

Desde entonces, el uso de marcadores genéticos estándares que flanqueen genes diferenciales de los microorganismos de interés (Schöller et al., 2017), como los introducidos para el análisis del gen 16S rRNA de la subunidad ribosómica pequeña cuya región V3-V4, es la región objetivo que ha ganado popularidad desde su desarrollo y uso por parte del Proyecto Genoma de la Tierra (<https://www.earthgenome.org/>). Esta región es ampliamente utilizada para comparar diferentes estudios de diversidad y para la reproducción de los análisis (Caporaso et al., 2012; Jurburg et al., 2020).

En consecuencia, es vital obtener metadatos de alta calidad y abundancia para predecir la estructura y la dinámica de las comunidades microbianas de interés que en el momento del muestreo haya estado libre o dentro de las células microbianas y más o menos intacto (Taberlet et al., 2012); todas estas consideraciones componen a los estudios en metabarcoding (Degruene et al., 2017; Peiffer et al. 2013).

Por estas razones, el objetivo del metabarcoding de DNA es identificar y caracterizar enteramente taxones; como se podría realizar con técnicas de la metagenómica pero que está principalmente describe el análisis funcional de los genomas microbianos contenidos en una muestra ambiental (Riesenfeld et al., 2004; Taberlet et al., 2012).

El flujograma de trabajo del metabarcoding para microorganismos asociados a la rizósfera de los suelos, inicia con el muestreo del suelo, la extracción del eDNA de cada zona muestreada que luego se combina a fin de amplificar y evidenciar la etiqueta genética diferencial de procariotas amplificando el gen 16S rARN mediante PCR (Francioli et al., 2021; Lear et al., 2018).

Los amplicones derivados del PCR fueron etiquetados y con la ayuda de adaptadores se secuencian con la plataforma Illumina MiSeq y se obtuvieron secuencias de nucleótidos (reads, en inglés) con el tamaño de la región V3 V4 (300 pares de bases) que constituyen los códigos de barras de DNA de procariotas (Dopheide et al., 2019).

Finalmente, para realizar el metaanálisis de la abundancia y diversidad microbiana, se agrupan las lecturas con regiones taxonómicas relacionadas utilizando unidades taxonómicas operativas (OTU) o Variantes de Secuencia del Amplicón (ASV, en inglés) a un nivel de similitud del 97% (Callahan et al., 2017; Fricker et al., 2019).

A partir de ello, junto a la metadata se logra inferir y estimar la diversidad (índices de Shannon y Simpson y la uniformidad de Pielou), la riqueza (índices de Chao) y la abundancia (ACE) microbiana (Foulon et al., 2016; Hong et al., 2015) así como datos ecológicos.

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

El presente estudio fue una investigación básica que tuvo como objeto de estudio a la diversidad microbiana de la rizósfera de bofedales impactados y no impactados, donde se realizaron procedimientos *in vitro* y análisis *in silico*.

A su vez, fue una investigación transversal por realizarse la obtención de la data en un único momento. Con ello, el objetivo de esta investigación permitió describir la situación actual de la microbiota asociada a los suelos del bofedal bajo presiones antrópicas y climáticas, por lo que se proyecta para futuros estudios de restauración ecológica.

3.2. Ámbito temporal y espacial

El muestreo de los suelos asociados a la rizósfera se realizó en el bofedal de Pumacocha, provincia de Pomabamba, región de Ancash - Perú (**Figura 1** y **Tabla 1**). El DNA ambiental microbiano de los suelos se procesó y analizaron durante 8 meses desde octubre del 2021 hasta mayo del 2022 en el Área de Biología Molecular y Genómica del laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), ubicada en la ciudad de Chachapoyas, región de Amazonas, nororiente del Perú.

3.3. Variables

- **Variable independiente:** Variables fisicoquímicas del suelo del bofedal
- **Variable dependiente:** Diversidad de procariontes de la rizósfera

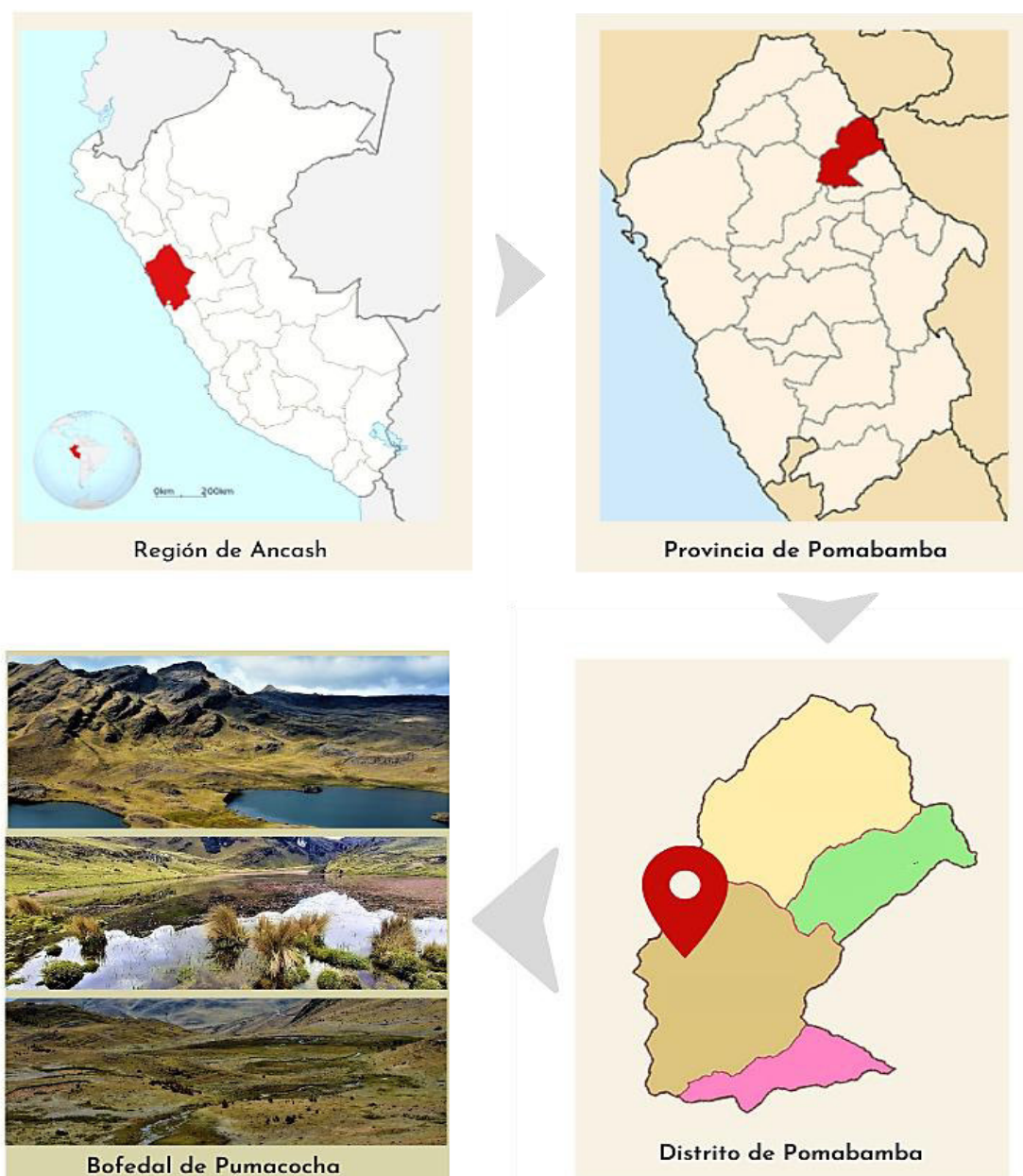
3.4. Población y muestra

La población de estudio fue el suelo rizosférico del bofedal situado en Pumacocha. A partir de las zonas accesibles y más representativas de toda la extensión del bofedal, se determinaron las zonas de muestreo impactadas y no impactadas, que en total incluyeron 30 muestras seleccionadas bajo un muestreo por conveniencia, una técnica de muestreo no probabilística (Otzen y Manterola, 2017).

De dicho suelo, se extrajo y obtuvo la data genética del eDNA, del que solo se consideró el DNA procariota (bacterias y arqueas) para el presente estudio. Se excluyó data proveniente de la contaminación durante el procesamiento de las muestras.

Figura 1

Mapa de ubicación del bofedal de Pumacocha



Nota: Imagen de elaboración propia. Fotos del bofedal de Pumacocha, tomadas por encargados de la ONG Yuran Yaqu, responsables del Proyecto Prociencia N°035-2021.

Tabla 1*Ubicación cartográfica de las tres zonas de muestreo*

		<i>Latitud Sur</i>	<i>Latitud Oeste</i>
<i>Zona 1</i>	<i>Zona no impactada</i>	8° 45' 54"	77° 34' 52"
	<i>Zona Impactada</i>	8° 45' 54"	77° 34' 57"
<i>Zona 2</i>	<i>Zona no impactada</i>	8° 45' 54"	77° 34' 52"
	<i>Zona Impactada</i>	8° 45' 54"	77° 34' 57"
<i>Zona 3</i>	<i>Zona no impactada</i>	8° 45' 54"	77° 34' 52"
	<i>Zona Impactada</i>	8° 45' 54"	77° 34' 57"

3.5. Instrumentos**3.5.1. Instrumentos de muestreo**

- Treinta tubos Falcon de 15 ml de plástico con tapa rosca.
- Una solución de preservación DNA/RNA Shield (Zymo Research, EE. UU.)

3.5.2. Instrumentos de análisis in vitro

Para el procesamiento de las muestras de suelo hasta la obtención del DNA se emplearon:

- Materiales de laboratorio:

Se utilizaron 6 cucharas pequeñas de acero, 6 morteros con pilón de cerámica, 30 tubos Falcon de 30 ml, microtubos de 1,5 ml y 2 ml, puntas para micropipetas de 10µl, 200µl y 1000µl y soportes para microtubos.

- Equipos e instrumentos de laboratorio:

Refrigeradora (LG, Colombia), Micropipetas de 10µl, 200µl y 1000µl (Nichepet, Japón), Vortex Mixer (Labnet International, México), mini centrifuga (Micro spinner PRISM

™ MINI, Corea del Sur), microcentrífuga digital (Labnet International, México), Thermoblock (Labnet International, China), Termociclador de PCR (BioRad, Singapur), Cámara de electroforesis (VMR, Reino Unido) y Software AIDA del fotodocumentador de electroforesis (SmartView Pro-1100 Imagen System), Espectrofotómetro Nanodrop (Eppendorf BioSpectrometer® basic, Alemania) y Fluorómetro Quantus™ (Promega, EE. UU.).

- Insumos químicos:

Kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (D4300, Zymo Research), cloruro de calcio (CaCl₂) al 0,5 M, agua ultrapura y etanol al 94%. El kit de ensayo Qubit RNA Broad-Range (Invitrogen de ThermoFisher, EE. UU.).

3.5.3. Instrumentos de análisis in silico

Para el análisis del DNA obtenido a partir de los suelos se requirió:

- Servicio de secuenciación con la plataforma Illumina MiSeq, realizado por la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur).
- Servicio gratuito de lenguaje de programación para análisis estadístico del software RStudio (RStudio Team, 2020).
- Servicios bioinformáticos de acceso libre: paquetes bioinformáticos útiles para predecir ASVs como DADA2 (Callahan et al., 2016) en R Studio y bases de datos de referencia como SILVA (Pruesse et al., 2007). Y otros, que se detallaron en procedimientos.

3.6. Procedimientos

Se realizó el muestreo y análisis fisicoquímico de los suelos con y sin impacto antropogénico en los suelos del bofedal de interés, las muestras de suelos se preservaron química y físicamente hasta realizar la extracción de DNA incluyéndose en este proceso tratamientos químicos y físicos; cuyos DNA extraídos se secuenciaron. Con ello, se obtuvo la información bioinformática para su posterior análisis e interpretación de los resultados.

3.6.1. Muestreo de suelos rizosféricos de bofedales

Se realizó la previa ubicación cartográfica del bofedal de Pumacocha del lugar de muestreo (**Figura 2, ANEXO A**). Las muestras de suelo rizosférico en las zonas con impacto antropogénico del bofedal en las zonas con impacto antropogénico del bofedal se recolectaron siguiendo la metodología propuesta por Cobo-Díaz et al. (2015).

El muestreo incluyó 3 zonas del humedal y por cada zona se tomaron 10 puntos (5 muestreos con signos de impacto antropogénico y 5 sin signos de impacto antropogénico) obteniéndose en total 30 muestras por cada área.

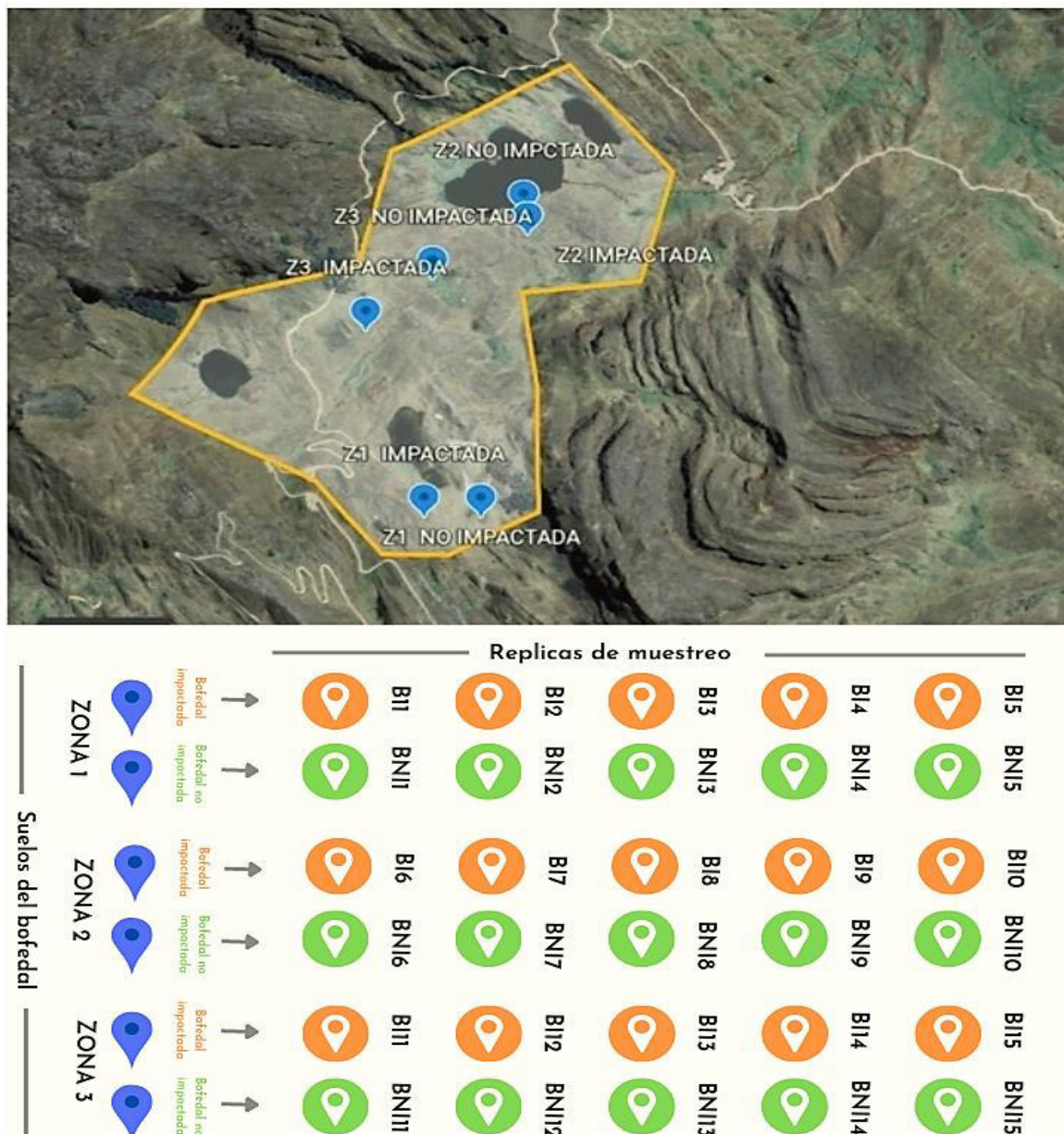
El impacto antrópico de las zonas se determinó visualmente tomando los siguientes criterios tangibles: la vegetación del suelo (Abou & Ottow 1985; Chapuis-Lardy et al., 2007) y la presencia de heces de camélidos por el sobrepastoreo. En cada área se mantuvo una distancia de separación de 10 m por muestreo, donde la muestra se obtuvo tomando 15 g de suelo descartando la capa superior a profundidades de 5 a 25 cm.

3.6.2. Preservación de las muestras de suelos

Se mezclaron los 10 g de cada muestra de suelo con 20 mL de la solución de preservación DNA/RNA Shield (Zymo Research) hasta que la solución recubrió toda la muestra; las 30 muestras se refrigeraron a 1°C durante 6 meses (Delavaux et al., 2020; Venturini, et al., 2020) en el Área de Biología Molecular y Genómica del laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM).

Figura 2

Ubicación geográfica de las zonas muestreadas



Nota: Se designaron 3 zonas de muestreo, cada una con impacto antropogénico (heces por el pastoreo) o presencia de vegetación; y otra sin impacto. Se tomaron 5 réplicas de muestras de suelo de estas zonas. Foto tomada con Google Earth por encargados de la ONG Yuran Yaqu responsables del Proyecto Prociencia N°035-2021 (fecha de acceso 20/09/22).

3.6.3. Análisis físico – químicos de suelos

Se realizaron estudios fisicoquímicos (**ANEXO B**) a fin de conocer el tipo y textura del suelo (%limo, %arcilla y %arena), el porcentaje de materia orgánica (m.o.), la cantidad de fósforo (P p.p.m) y potasio (K p.p.m), pH del suelo, la conductividad eléctrica y la concentración de cationes intercambiables (Ca^{++} , Mg^{++} , Na^* , K^- y $\text{Al}^{+3}+\text{H}^{+1}$) de los suelos de la rizósfera muestreados.

Luego, se realizó la prueba estadística de ANOVA mediante el software de R Studio (**Tabla 2**), a fin de evaluar si existían diferencias significativas en las variables ambientales en las zonas de estudio, ello se visualizó mediante gráficas de cajas de boxplot usando el software XLSTAT (Addinsoft, 2022) donde, las cajas que se sobrelapan no mostraron variación y en caso no se sobrelapen mostrarían diferencias en sus valores.

3.6.4. Extracción del eDNA de suelos

En primer lugar, se realizó el pesaje de 0,8 gr del suelo para ser colocado en cada tubo, previamente quitando impurezas como raíces de gran tamaño y piedras. Se obtuvieron dos réplicas por cada muestra, por lo que se realizaron dos procesos de extracción de DNA por cada muestra.

La extracción del eDNA se realizó utilizando el protocolo del kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (D4300, Zymo Research modificado, cuyo proceso se explica a continuación. Se vertió el suelo en el tubo de lisis contenida con microperlas, al que se le añadió la solución de lisis incubando por 30 min en vortex; luego, se centrifugó y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo de 2ml al que se le añadió 1ml de CaCl_2 al 5M (Li et al., 2011), se mezcló y centrifugó a 12500 rpm x 1,5 min.

Se repitió este paso 4 veces hasta que el precipitado de coloración marrón, característica del contaminante contenido de ácidos húmicos y fúlvicos (Cheng et al., 2016; Donaire et al., 2017), fuera mínimo hasta ser imperceptible y sin sedimentación (**ANEXO C**).

Seguidamente, el último sobrenadante obtenido, pasó por el filtro de eliminación de impurezas; al flujo obtenido en el tubo colector se añadió 800 μl de solución de unión al DNA y 400 μl de etanol al 94%. Posteriormente, se usó el procedimiento detallado por el protocolo del kit de extracción.

Se obtuvieron 60 extracciones que se almacenaron a -20°C . A fin de obtener muestras compuestas, las dos réplicas de cada muestra fueron mezcladas en un tubo. Al final del proceso, se obtuvieron 30 extracciones de eDNA (15 tubos de las zonas impactadas y 15 tubos de las zonas no impactadas).

Las extracciones de DNA se visualizaron cualitativamente mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,0% del buffer TBE, cargando en cada pocillo 5 μl de DNA de Ladder de 1Kb, y 4 μl del DNA de cada muestra se tiñó con 1 μl del colorante SYBR GREEN, se corrió a 120V por 15 min; las fotografías de las corridas electroforéticas se realizaron en un fotodocumentador SmartView Pro UVCI-1000. Marca Major Science, las que se revelaron mediante el software AIDA (Laurent et al., 2001; Sagova-Mareckova. et al., 2008; Xie et al., 2018).

3.6.5. Cuantificación de eDNA de suelos

Se estimó la calidad y cantidad del eDNA extraído de las 30 muestras del suelo empleando dos técnicas de cuantificación: a) Espectrofotometría, que mediante las curvas de absorbancia se pudo medir la presencia del DNA (260/230 nm) de suelos y contaminantes de este (260/280 nm) usando un equipo Nanodrop (Eppendorf BioSpectrometer® basic,

Alemania) (**ANEXO D**) y b) Fluorimetría con la tinción SYBR GREEN específico al DNA, mediante el uso del Fluorómetro Quantus™ (Promega, USA) que designó resultados en ng/ul.

Adicionalmente, las muestras de DNA se envió a la compañía Macrogen, donde se realizó una cuantificación de DNA mediante fuorometría, con el uso del reactivo Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA, tinción fluorescente ultrasensible para cuantificar el DNA de doble cadena (dsDNA) en solución, el cual permite cuantificar tan solo 250 pg/ml de dsDNA (50 pg de dsDNA en un volumen de ensayo de 200 µl) con un lector de microplacas de fluorescencia utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de fluoresceína (**ANEXO E**).

Los datos cuantitativos obtenidos de las concentraciones de DNA (*ng/ul*) mediante espectrofotometría y fluorimetría se compararon mediante gráficas de violín usando el software XLSTAT de ambas zonas en estudio a fin de evaluar la técnica de cuantificación de DNA más precisa para este estudio.

El cálculo de los parámetros de las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro del DNA de suelo de cada muestra de zonas con y sin impacto antropogénico, se compararon mediante gráficos de barras usando el software de Microsoft Excel.

3.6.6. Amplificación y Secuenciación del DNA de suelos

La amplificación y secuenciación Miseq, utilizando la biblioteca de DNA True Seq, del amplicón 16S rRNA de la región V3-V4 (300 pares de bases, pb) se realizó comercialmente en la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y se emplearon los primers Bakt_341F: CCTACGGGNGGCWGCAG y Bakt_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC. Con ello se obtuvo la data cruda en dos archivos “fastq” de la secuencia Forward y Reverse por cada muestra.

3.6.7. *Procesamiento bioinformático*

- **Control de calidad y clasificación taxonómica**

A todos los archivos fastq de secuenciación emparejada se sometieron a un previo tratamiento mediante el software R Studio. El control de calidad inició comprobando los valores de Phred y la ausencia de adaptadores mediante el software en FastQC v0.11.9 (Simon, 2020) (**ANEXO F y G**).

Los datos se procesaron con el pipeline DADA2 v1.20.0 (Callahan et al. 2016). Se utilizaron parámetros de filtro estándar ($\text{truncLen} = c(285,205)$, $\text{maxN} = 0$, $\text{truncQ} = 2$ y $\text{maxEE} = c(2,2)$; se descartaron las longitudes inferiores a 200 pb) luego, se creó un modelo de error con el mismo paquete de DADA2 para inferir los ASVs (**ANEXO H**) y las secuencias de Forward y Reverse de cada muestra se parearon para elaborar una secuencia consenso.

El proceso bioinformático de los “reads” continuó con la eliminación de las quimeras formadas (que representaban el 39%) utilizando la opción `removeBimeraDenovo` y se eliminó el ruido de fondo de los datos con la función `getUniques`; con ello se obtuvo secuencias listas (secuencias output) para el proceso de análisis bioinformático (**ANEXO I**).

Se continuó con la asignación taxonómica de los ASVs, mediante la función `assignTaxonomy` se asignó hasta el nivel de género utilizando la base de datos procariontas de capacitación taxonómica SSU formateados para DADA2 Silva 138.1 (McLaren & Callahan, 2021).

Se creó un objeto `phyloseq` rarefactado y filtrado (McMurdie PJ & Holmes, 2017), que incluyó datos de OTU Table: [17850 taxa and 6 samples], Sample Data: [6 samples by 15 sample variables], Taxonomy Table: [17830 taxa by 6 taxonomic ranks] y un Phylogenetic Tree: [17830 tips and 17828 internal nodes.

3.7. Análisis de datos

La diversidad alfa, en base al objeto phyloseq rarefactado (**ANEXO J**), se determinó utilizando los programas, Vegan (Community Ecology Package, s.f.) y ggplot2 (Wickham, 2016) para obtener los valores Chao1 (estimador de riqueza), y de Shannon y Simpson (estimadores de diversidad y uniformidad o equitatividad) (Foulon et al., 2016; Hong et al., 2015). Para la generación del árbol filogenético se utilizó el paquete ape v5.3 (Paradis & Schliep, 2018).

Mientras que la diversidad beta, se determinó con el objeto phyloseq inicial, se evaluaron mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con el índice de disimilitud de Bray-Curtis para visualizar la agrupación de las muestras individuales.

A partir de los 17850 ASVs se analizó la distribución de la profundidad de secuenciación en R Studio a fin de garantizar la confiabilidad de los posteriores análisis (**ANEXO K**).

Luego, se calculó la cantidad total de ASVs de los 24 géneros bacterianos más representativos de las áreas 1, 2 y 3 de muestreo de las zonas impactadas y no impactadas, con ello se realizó la prueba estadística de ANOVA mediante el software de R Studio, a fin de evaluar si existían diferencias significativas en los géneros bacterianos en las zonas de estudio.

La composición taxonómica se analizó mediante las abundancias relativas (enfocada en expresar la proporción de dicha TAXA en cada muestra, en base a las diversas secuencias de DNA que lo representan, es decir en base a los ASVs).

Se visualizó la composición taxonómica mediante gráfico de barras usando el software R Studio y mediante mapas de calor con el software Primer v7 a fin de conocer las abundancias relativas de los Filos, Familias y géneros bacterianos. Así mismo, se calculó la prevalencia de estos géneros bacterianos mediante el software R Studio v. 4.2.2.

Así mismo, la metadata que contenía datos de los factores abióticos (características fisicoquímicas, climáticas, geográficas y nivel de perturbación antrópica determinada por la presencia de heces ligada al sobrepastoreo y poca vegetación) del bofedal de Pomacocha, se realizó una prueba de ANOVA mediante el software de R Studio, para identificar si existían diferencias significativas en las variables ambientales en ambas zonas de estudio.

Finalmente, las variables que tenían diferencias significativas en ambas zonas de estudio se sometieron a un análisis de correlación con la biodata mediante la prueba estadística PERMANOVA mediante la función "adonis 2" en el software R Studio, a fin de identificar si la composición bacteriana de ambas zonas de estudio estaba influenciada por una o más variables ambientales.

Posterior a ello, se visualizó mediante la gráfica de Análisis de Redundancia (RDA, en inglés) el software XLSTAT las variables ambientales que estaban involucradas en la distribución taxonómica en las zonas de estudio; ya que, esta gráfica relaciona linealmente a las variables dependientes o variables respuesta representadas en el eje X (abundancia bacteriana a nivel de género) con las variables independientes o explicativas representadas en el eje Y (parámetros fisicoquímicos) donde visualmente, ambos tipos de variables se relacionaron según la cercanía a las flechas que representan variables cualitativas como las zonas impactadas y no impactadas .

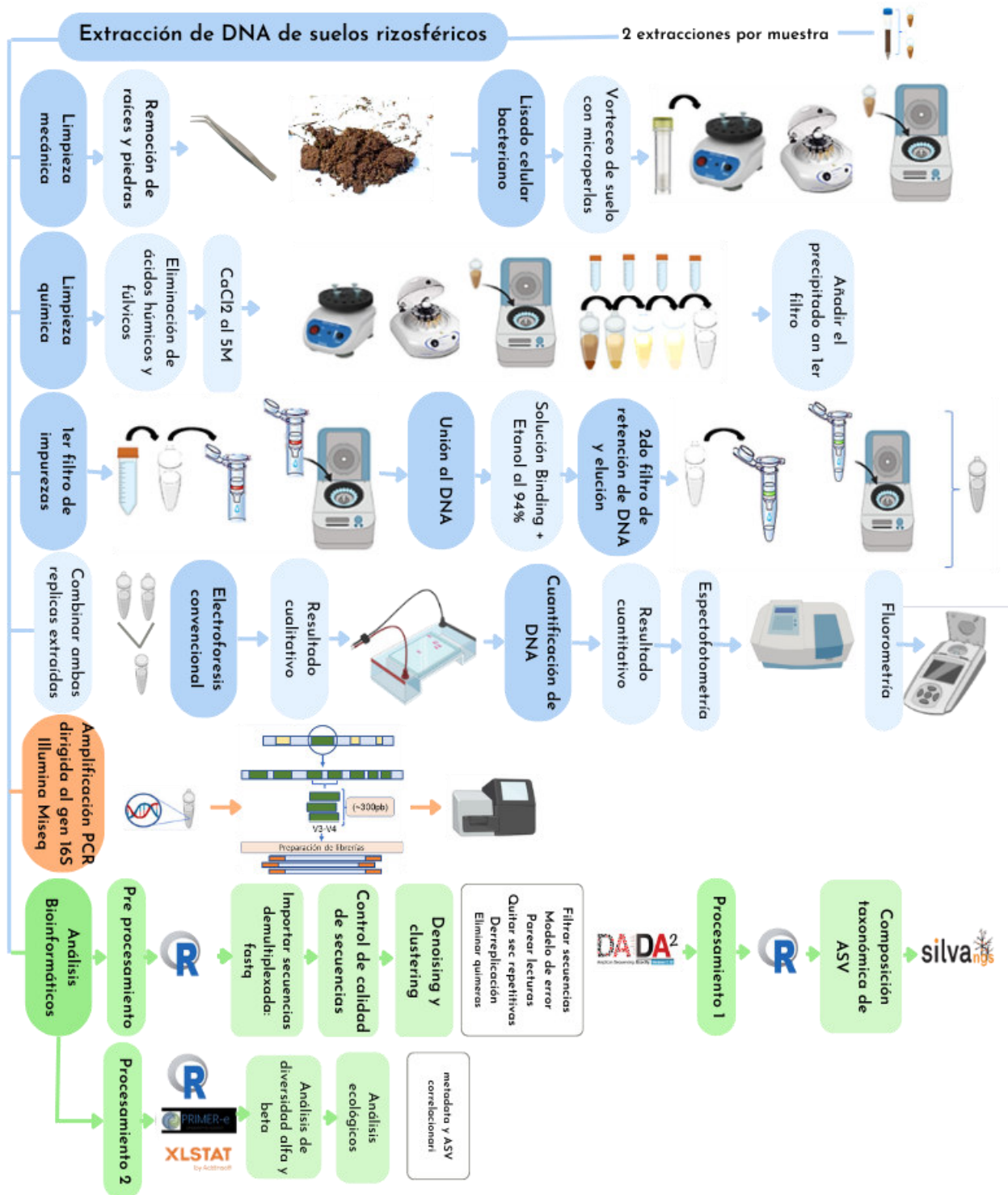
Para una mejor comprensión se esquematizó el flujo de trabajo (**Figura 3**).

3.8. Aspectos éticos

La investigación se llevó a cabo con el permiso de acceso otorgado a la ONG Yuraq Yaqu, siendo los representantes los encargados de realizar el muestreo en el bofedal de Pumacocha en Ancash, Perú.

Figura 3

Flujograma de extracción, secuenciamiento y análisis computacional del DNA de suelos



Nota: Diagrama de elaboración propia, equipos y software fueron citados y detallados en metodología.

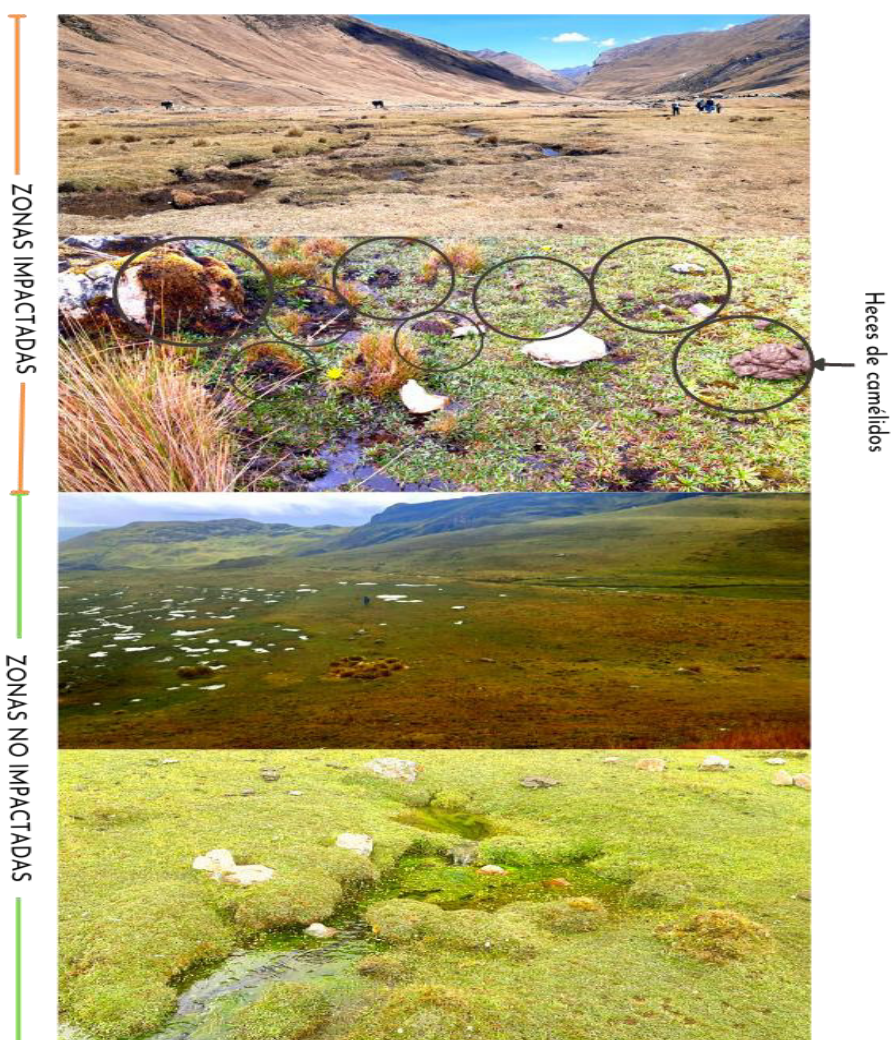
IV. RESULTADOS

4.1. Zonas de muestreo con impacto antropogénico

El bofedal está ubicado geográficamente entre las cordilleras, por lo cual es un humedal ácido, y de importancia económica local para los pobladores. El estudio se realizó en una época seca (15 – 16 de agosto del 2021) y se observó un impacto antropogénico por presencia de heces y nivel de vegetación diferenciada en ambas zonas de estudio (**Figura 4**).

Figura 4

Zonas de muestreo de suelos rizosféricos del bofedal de Pumacocha (Ancash-Perú)



Nota: Fotos del suelo del bofedal de Pumacocha, tomadas por encargados de la ONG Yuran Yaqu, responsables del Proyecto Prociencia N°035-2021.

4.2. Predominancia de especies vegetales en las zonas de estudio

Se observó que las especies vegetales identificadas en las zonas no impactadas (ZI-1, ZI-2 y ZI-3) del suelo del bofedal en época seca (15 – 16 de agosto del 2021) incluyeron (en orden decreciente) a *Distichia muscoides*, una especie de planta herbácea responsable de la formación almohadillados vegetales densos; *Oxichloe andina* *Oreobolus obtusangulus*, *Plantago rígida* y *Werneria pygmaea*.

También se distinguió que las especies vegetales identificadas en las zonas impactadas (ZNI-1, ZNI-2 y ZNI-3) del suelo del bofedal en época seca (agosto del 2021) incluyeron (en orden decreciente) a: *Distichia muscoides*, *Oxichloe andina* y *Plantago rígida* (**Tabla 2**).

Tabla 2

Identificación visual de especies vegetales presentes en las zonas de estudio

Zonas no impactadas	ZNI-1	<i>Distichia muscoides</i>
		<i>Oreobolus obtusangulus</i>
		<i>Oxichloe andina</i>
		<i>Plantago rigida</i>
	ZNI -2	<i>Distichia muscoides</i>
		<i>Oreobolus obtusangulus</i>
		<i>Oxichloe andina</i>
		<i>Werneria pygmaea</i>
	ZNI-3	<i>Distichia muscoides</i>
		<i>Oxichloe andina</i>
		<i>Plantago rigida</i>
		<i>Werneria pygmaea</i>

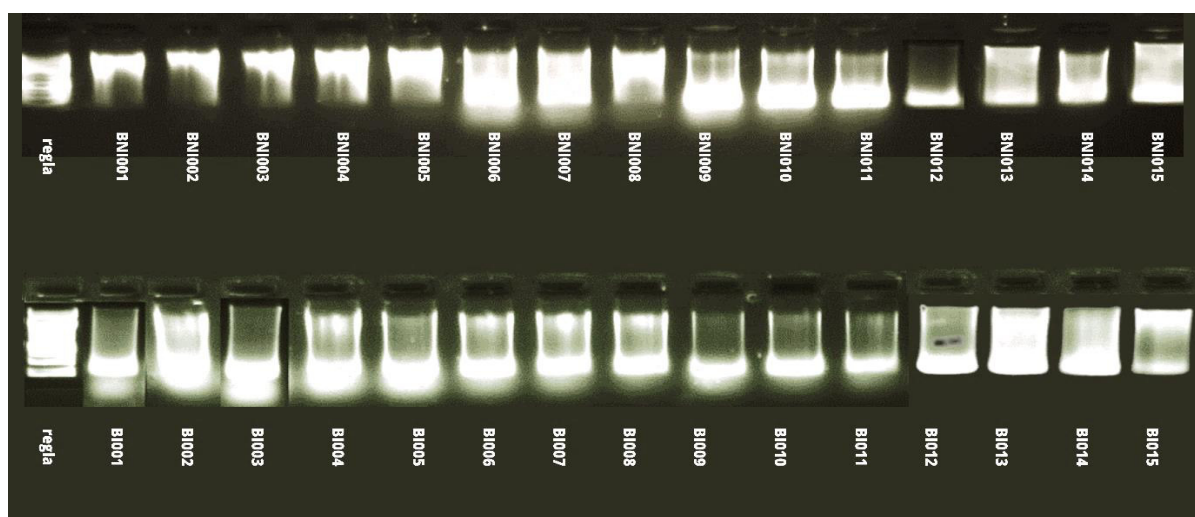
Zonas impactadas	ZI-1	<i>Distichia muscoides</i> <i>Oxichloe andina</i> <i>Werneria pygmaea</i>
	ZI-2	<i>Distichia muscoides</i>
	ZI-3	<i>Distichia muscoides</i> <i>Oxichloe andina</i> <i>Plantago rigida</i>

4.3. Extracción de DNA de suelos rizosféricos

Para evaluar la calidad de DNA extraído cualitativamente, se puede observar presencia de bandas de DNA de suelos en la electroforesis horizontal, para las 3 zonas impactadas y no impactadas; en los casos donde no se observó una banda compacta de DNA fue posiblemente por la presencia de contaminantes propios del suelo evidenciado en el arrastre del DNA hacia la parte superior (**Figura 5**).

Figura 5

Electroforesis horizontal del DNA de suelos en gel de agarosa



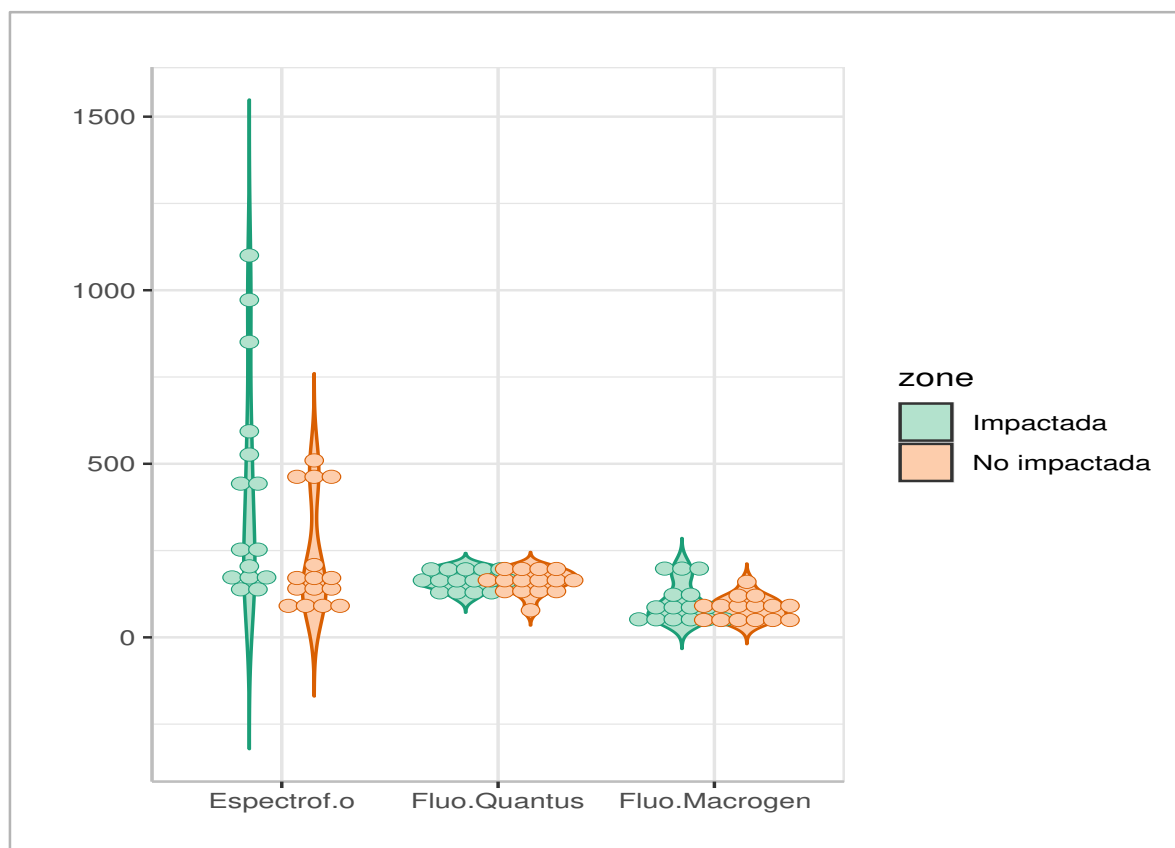
Nota: Presencia de bandas de DNA de suelos rizosféricos de las zonas no impactadas (zona superior) y de las zonas impactadas (zona inferior).

Paralelamente, se evaluó cuantitativamente la calidad del DNA extraído del suelo mediante espectrofotometría y fluorimetría. En la cuantificación por fluorimetría, se observó menor grado de error y mayor homogeneidad entre las concentraciones obtenidas de las 15 muestras de DNA de las 3 zonas impactadas y de las que se obtuvo a partir de las 15 muestras de las 3 zonas no impactadas (**Figura 6**).

La cuantificación del DNA por fluorimetría dio mayor homogeneidad en su análisis demostrando DNA óptimos para continuar con los posteriores análisis.

Figura 6

Comparación de los métodos de cuantificación de DNA de suelos



Nota: Gráfica de violín de las concentraciones de DNA (ng/ul) por Espectrofotometría (Eppendorf BioSpectrometer® basic), Fluorimetría (Quantus™ Fluorometer – Promega) con SYBR-GREEN y Fluorimetría Illumina Miseq por la empresa Macrogen con PICO-GREEN

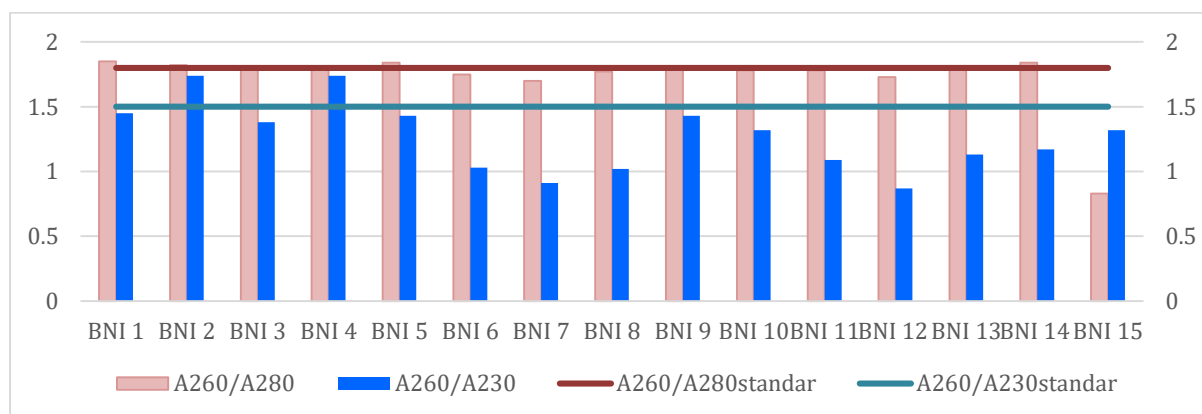
el DNA de suelos rizosféricos de ambas zonas del bofedal en estudio. Se visualizó mediante el software XLSTAT.

Se evaluó la pureza y calidad del DNA extraído mediante la lectura de los parámetros según su densidad óptica (D.O.) las absorbancias de todas las muestras de las 3 zonas impactadas y no impactadas, a fin de detectar la presencia de contaminantes (relación 260/280 nm = 1.8 a 1.9) y umbrales de concentración de DNA (relación 260/230 nm = 1.5) permisibles, según el manual técnico de DNA genómico del suelo (MACHEREY-NAGEL, 2015).

Se observó que más del 75% de las muestras de las 3 zonas no impactadas presentaron DNA aceptable cercano a 1,5 (260/230 nm). Por otro lado, no hubo cantidades significativas de impurezas (como los ácidos húmicos) al mostrar valores cercanos a 1,8 (260/280 nm) en casi el 95% de las muestras (**Figura 7**).

Figura 7

Lectura de absorbancias de impurezas y DNA de suelos no impactados mediante Espectrofotometría



Nota: A260/A230: Ratio de absorbancias de DNA de suelos. A260/A280: Ratio de absorbancias de impurezas proteicas y fenólicas como los ácidos húmicos de suelos. Zonas sin impacto antropogénico en los suelos rizosféricos del área muestral 1 (BNI 1, BNI 2, BNI 3,

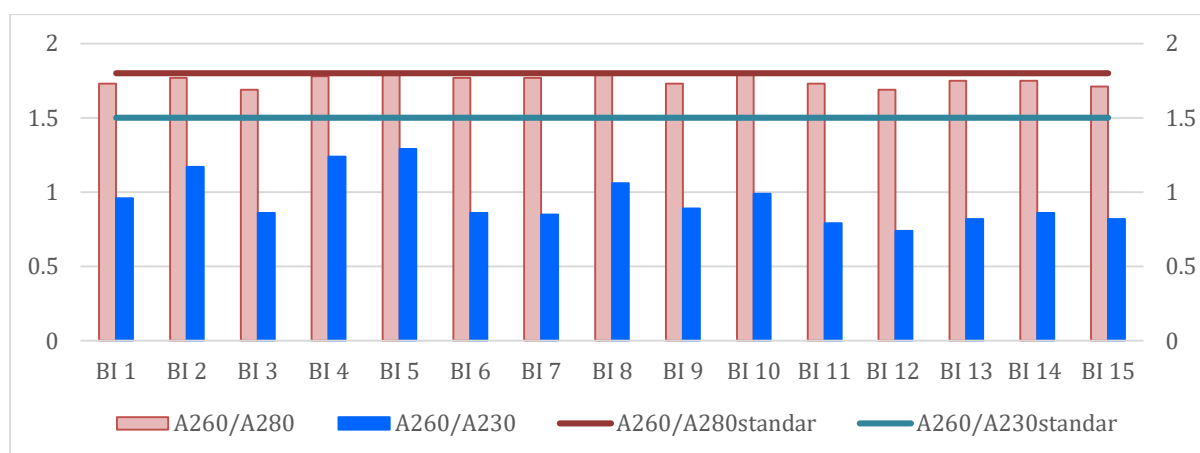
BNI 4, BNI 5); área muestral 2 (BNI 6, BNI 7, BNI 8, BNI 9, BNI 10) y área muestral 3(BNI 11, BNI 12, BNI 13, BNI 14, BNI 15).

Así mismo, mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260/230 nm, se observó que casi el 75% de las muestras de la zona impactada presentaron DNA aceptable; respecto a la presencia de impurezas estas mostraron valores permisibles cercanos a 1.8 (Figura 8).

Figura 8

Lectura de absorbancias de impurezas y DNA de suelos impactados mediante

Espectrofotometría



Nota: A260/A230: Ratio de absorbancias de DNA de suelos. A260/A280: Ratio de absorbancias de impurezas proteicas y fenólicas como los ácidos húmicos de suelos. Zonas con impacto antropogénico en los suelos rizosféricos del área muestral 1 (BI 1, BI2, BI3, BI4, BI5); área muestral 2 (BI 6, BI7, BI8, BI9, BI 10) y área muestral 3 (BI 11, BI 12, BI 13, BI 14, BI 15).

4.4. Análisis fisicoquímicos de suelos

Se compararon los datos fisicoquímicos de las zonas impactadas y no impactadas mediante gráficas de boxplot.

De acuerdo con los resultados de los análisis estadísticos de varianza (ANOVA), se encontró que sólo cinco variables ambientales presentan diferencias significativas entre las zonas con y sin impacto antropogénico.

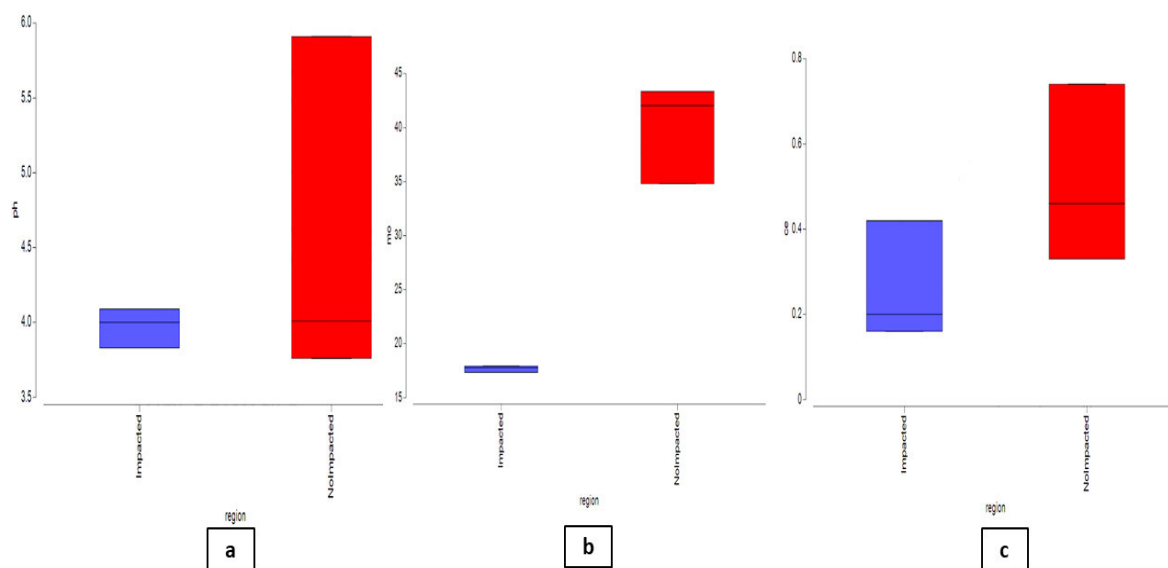
Estas variables son el tipo de suelo (arenoso o limoso) y los niveles de cationes de Ca^{++} , Mg^{++} y $\text{Al}^{+3}\text{H}^{+1}$, los cuales condicionan las características de ambos tipos de suelo y posiblemente la composición bacteriana (**Tabla 3**).

Así mismo, estas varianzas se corroboraron mediante gráficas de boxplot donde, tanto el pH (ZI =3.97, ZNI=4.56), los cationes intercambiables de Na^{+} (ZI=0.20 $\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$, ZNI=0.33 $\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$) y los porcentajes de suelo arcilloso (ZI=%5.05, ZNI=%4.39) se sobrelapan, esto reflejó que estos parámetros fisicoquímicos del suelo son semejantes en las zonas con y sin impacto antropogénico (**Figura 9, 10 y 11**).

No obstante, las cajas de boxplot de conductividad eléctrica (ZI= 0,26 dS/m, ZNI= 0,51 dS/m), materia orgánica (ZI= 17,69%, ZNI= 40,06%), cationes intercambiables de Ca^{++} (ZI=1.54 $\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$, ZNI=4.62 $\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$), Mg^{++} (ZI=0.38 $\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$, ZNI=1.21 $\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$), $\text{Al}^{+3}+\text{H}^{+1}$ (ZI=11.23 $\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$, ZNI=3.37 $\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$), a nivel de fósforo disponible (P_{ppm}) en el suelo (ZI=7.55 ppm, ZNI=21.74 ppm) y los porcentajes de suelo arenoso (ZI=%5.05, ZNI=%4.39) y limoso (ZI=%32.17, ZNI=%4.17); la medida de sus medias no se sobrelapan, demostrando que estos parámetros fisicoquímicos del suelo, posiblemente, difieran entre ambas zonas de estudio (**Figura 9, 10 y 11**).

Figura 9

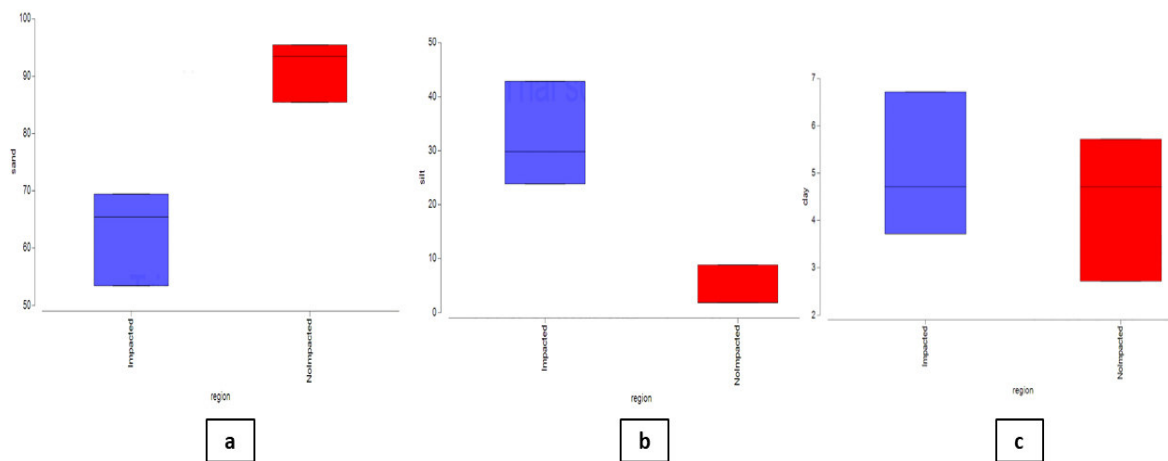
Parámetros fisicoquímicos principales del suelo



Nota: Gráficas de boxplot que muestran la comparación de la media de los valores de pH (a), materia orgánica (b) y conductividad eléctrica (c) entre las zonas impactadas (barras azules) y no impactadas (barras rojas) por actividad antropogénica en los suelos del bofedal de Pumacocha.

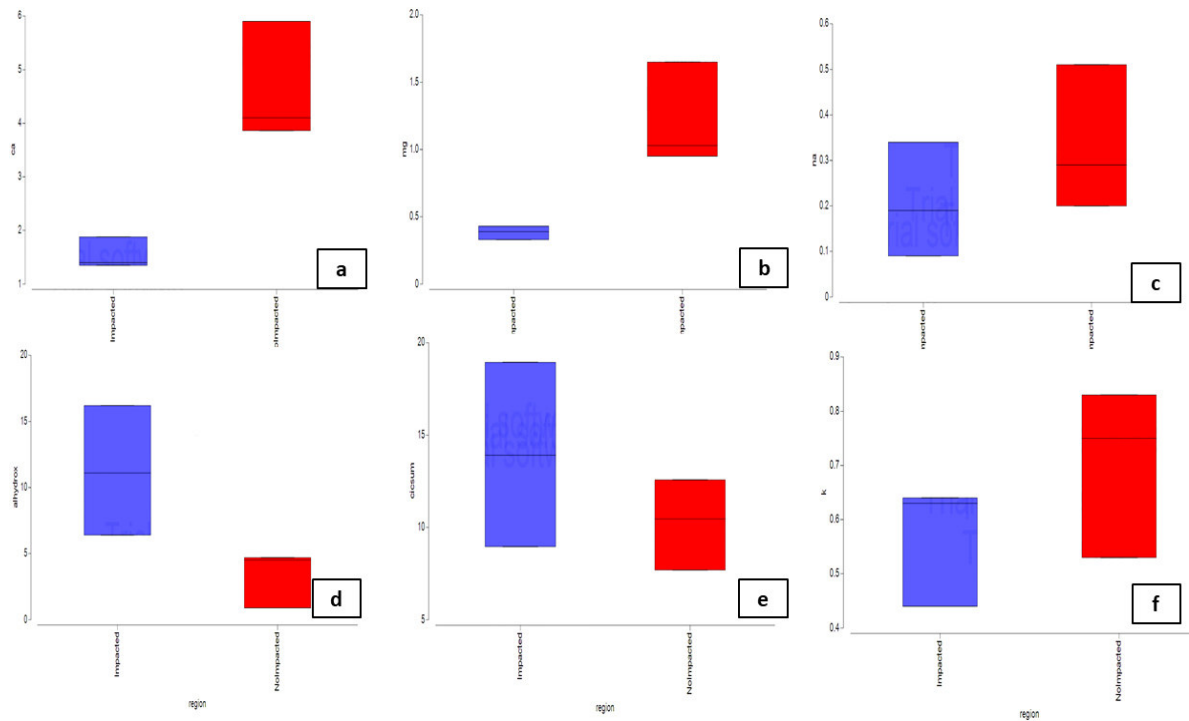
Figura 10

Parámetros fisicoquímicos según tipo de suelo



Nota: Gráficas de boxplot que muestran la comparación de las medias de los porcentajes de suelo arenoso (a), limoso (b) y arcilloso (c) entre las zonas impactadas (barras azules) y no impactadas (barras rojas) por actividad antropogénica en los suelos del bofedal de Pumacocha.

Figura 11 *Parámetros fisicoquímicos de cationes intercambiables del suelo*



Nota: a. Gráficas de boxplot que muestran la comparación de las medias de los cationes intercambiables Ca⁺⁺ (a), Mg⁺⁺ (b), Na⁺ (c), Al³⁺⁺H⁺¹ (d); cationes intercambiables totales (e) y K (f) entre las zonas impactadas (barras azules) y no impactadas (barras rojas) por actividad antropogénica en los suelos del bofedal de Pumacocha

Tabla 3*Análisis de varianza ANOVA de las variables ambientales*

N°	Variable ambiental	Zona
		ZI - ZNI
1	Arenoso	0.007 ^b
2	Limoso	0.009 ^b
3	Arcilloso	0.621 ^e
4	C.E.	0.163 ^e
5	pH	0.438 ^e
6	M.O.	0.001 ^a
7	P _(ppm)	0.230 ^e
8	K _(ppm)	0.238 ^e
9	Ca ⁺⁺	0.009 ^b
10	Mg ⁺⁺	0.021 ^c
11	Na ⁺	0.33 ^e
12	K ⁻	0.282 ^e
13	Al ⁺³ H ⁺¹	0.006 ^b

Rangos de significancia: ^a = 0 – 0.001; ^b = 0.002- 0.01; ^c = 0.02 - 0.05; ^d = 0.06 –

0.1; ^e = 0.2 - 1

4.5. Análisis de la composición taxonómica

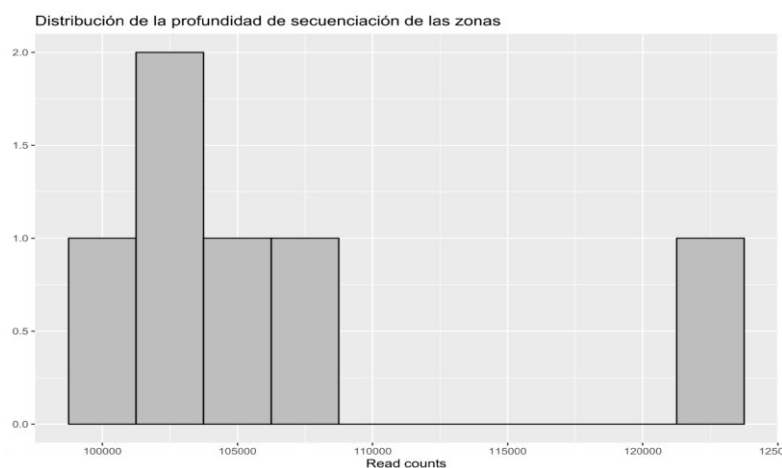
El procesamiento bioinformático de los “reads” de DNA de suelos de muestras provenientes de las tres áreas de muestreo, tanto con y sin impacto antropogénico, resultó en la identificación de 17850 ASVs (Amplicon Sequence Variants, en inglés) utilizando el objetivo "phyloseq" filtrado y rarefactado.

Se evaluó la distribución de la profundidad de secuenciación en las muestras analizadas con el objetivo de garantizar la confiabilidad de los resultados a obtener posteriormente. El análisis reveló una distribución de profundidad de secuenciación que oscila entre 0 y 2.

Esta variabilidad limitada en las muestras de las áreas de estudio indica que la mayoría de ellas alcanzaron una profundidad de secuenciación moderada del 50%, con una puntuación de 1, mientras que sólo una porción de las muestras llegó al 100% de profundidad, obteniendo una puntuación de 2 (**Figura 12**).

Figura 12

Distribución de la profundidad de secuenciación de las zonas de estudio



El análisis de la composición taxonómica a nivel de Reino reveló una alta representatividad de microorganismos pertenecientes al Reino Bacteria en comparación con el Reino Archaea. Dentro de este último, se identificaron únicamente 11 ASVs que correspondían a microorganismos taxonómicamente distintos.

En las áreas impactadas por la actividad humana, se hallaron cinco ASVs pertenecientes al filo Crenarchaeota y un ASV asociado al filo Micrarchaeota. Por otro lado, en las áreas no impactadas, se encontraron tres ASVs de Crenarchaeota, uno de Halobacteriota y uno de Nanoarchaeota.

En relación con el Reino Bacteria, se identificaron 35 filos, según las abundancias relativas basadas en las variantes de secuencia amplificada (ASVs).

Entre las 30 muestras tomadas de tres áreas con y sin impacto antropogénico, dos filos alcanzaron una frecuencia del 100% (Firmicutes y Proteobacteria), mientras que otros tres filos (Actinobacteriota, Planctomycetota y Verrucomicrobiota) aproximadamente llegaron al 80% de frecuencia en las muestras.

Por otro lado, el filo Chloroflexi presentó una frecuencia del 75% en las muestras analizadas. Finalmente, se identificaron 28 filos adicionales con una frecuencia cercana al 30% (**Figura 13**).

Por otro lado, se encontró diferencias en la composición taxonómica entre las zonas de estudio en 18 géneros bacterianos más predominantes con un nivel de significancia elevada de 0 a 0.001 (*Candidatus Solibacter*, *Rhodomicrobium*, *Roseiarcus*, *Candidatus Koribacter*, *Pedomicrobium*, *JG30a-KF-32*, *Bryobacter* y *Bradyrhizobium*), significancia media de 0.001 a 0.01 (*HSB OF 53-F07*, *Bacillus*, *Candidatus Xiphinematobacter*, *Candidatus Udaeobacter*, *Haliangium*, *Reyranella* y *Pajaroellobacter*) y una significancia baja de 0.01 a 0.05 (*Acidothermus*, *Clostridium sensu stricto* 9 y *Nitrobacter*) (**Tabla 4 y 5**).

A partir de los 23 géneros bacterianos más representativos, se evaluaron las diferencias significativas mediante el análisis de varianza (ANOVA). Se constató que la composición taxonómica en solo 4 géneros bacterianos fue similar en las zonas con y sin impacto antropogénico: *Aquisphaera*, *Mycobacterium*, *Conexibacter*, mle1-7 y 1921-2 (**Tabla 4**)

Figura 13

Prevalencia y abundancia de microorganismos a nivel de Filo

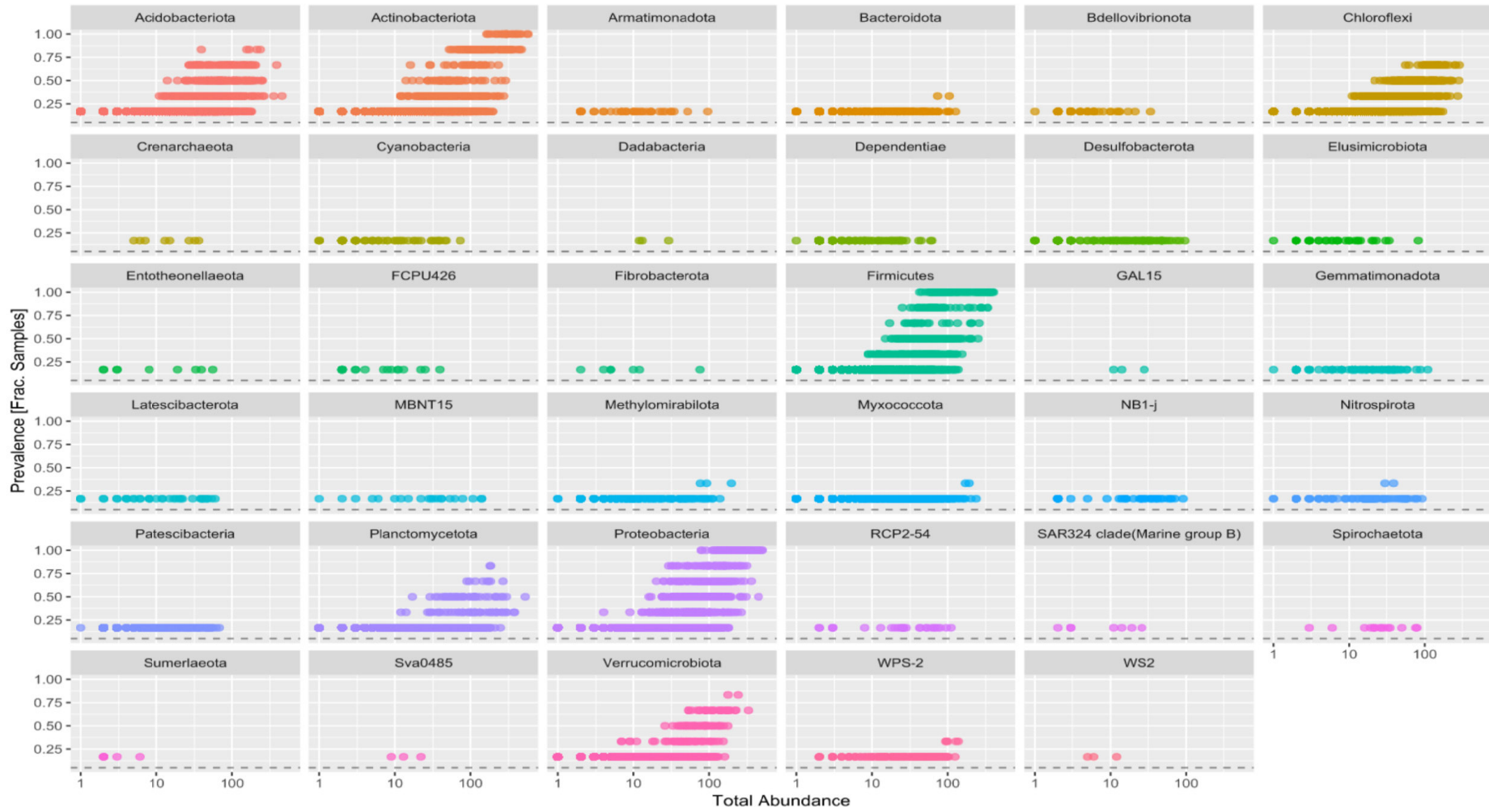


Tabla 4*Análisis de varianza ANOVA de los géneros bacterianos más representativos*

N°	Género	Zona	Zonas no impactadas			Zonas impactadas		
			ZI - ZNI	ZNI 1 - ZNI 2	ZNI 1 - ZNI 3	ZNI 2 - ZNI 3	ZI 1 - ZI 2	ZI 1 - ZI3
1	HSB OF 53- F07	0.004 ^b	0.916 ^e	0.999 ^e	0.793 ^e	0.027 ^c	0.516 ^e	0.591 ^e
2	Acidothermus	0.049 ^c	1.000 ^e	0.999 ^e	0.999 ^e	0.000 ^a	0.765 ^e	0.003 ^b
3	Bacillus	0.016 ^b	0.995 ^e	0.919 ^e	0.996 ^e	0.305 ^e	0.666 ^e	0.987 ^e
4	Candidatus Solibacter	0.001 ^a	0.299 ^e	0.437 ^e	1.000 ^e	1.000 ^e	0.827 ^e	0.934 ^e
5	Rhodomicro- bium	0.001 ^a	0.959 ^e	0.999 ^e	0.822 ^e	0.980 ^e	0.487 ^e	0.878 ^e
6	Roseiarcus	0.001 ^a	0.361 ^e	1.000 ^e	0.458 ^e	0.000 ^a	0.314 ^e	0.011 ^c
7	Candidatus Xiphinemato- bacter	0.005 ^b	0.015 ^c	1.000 ^e	0.018 ^c	0.982 ^e	0.999 ^e	0.895 ^e
8	Aquisphaera	0.220 ^d	0.032 ^c	0.997 ^e	0.085 ^d	0.201 ^e	0.957 ^e	0.641 ^e
9	Candidatus Udaeobacter	0.011 ^b	0.171 ^e	0.054 ^d	0.993 ^e	0.122 ^e	0.831 ^e	0.696 ^e
10	Candidatus Koribacter	0.002 ^a	0.102 ^e	0.381 ^e	0.971 ^e	0.579 ^e	0.991 ^e	0.891 ^e
11	Pedomicrobium	4.35e ^{-06a}	1.000 ^e	1.000 ^e	1.000 ^e	0.570 ^e	0.299 ^e	0.010 ^b
12	JG30a-KF-32	9.49e ^{-08a}	0.000 ^a	0.000 ^a	0.866 ^e	0.375 ^e	0.975 ^e	0.805 ^e

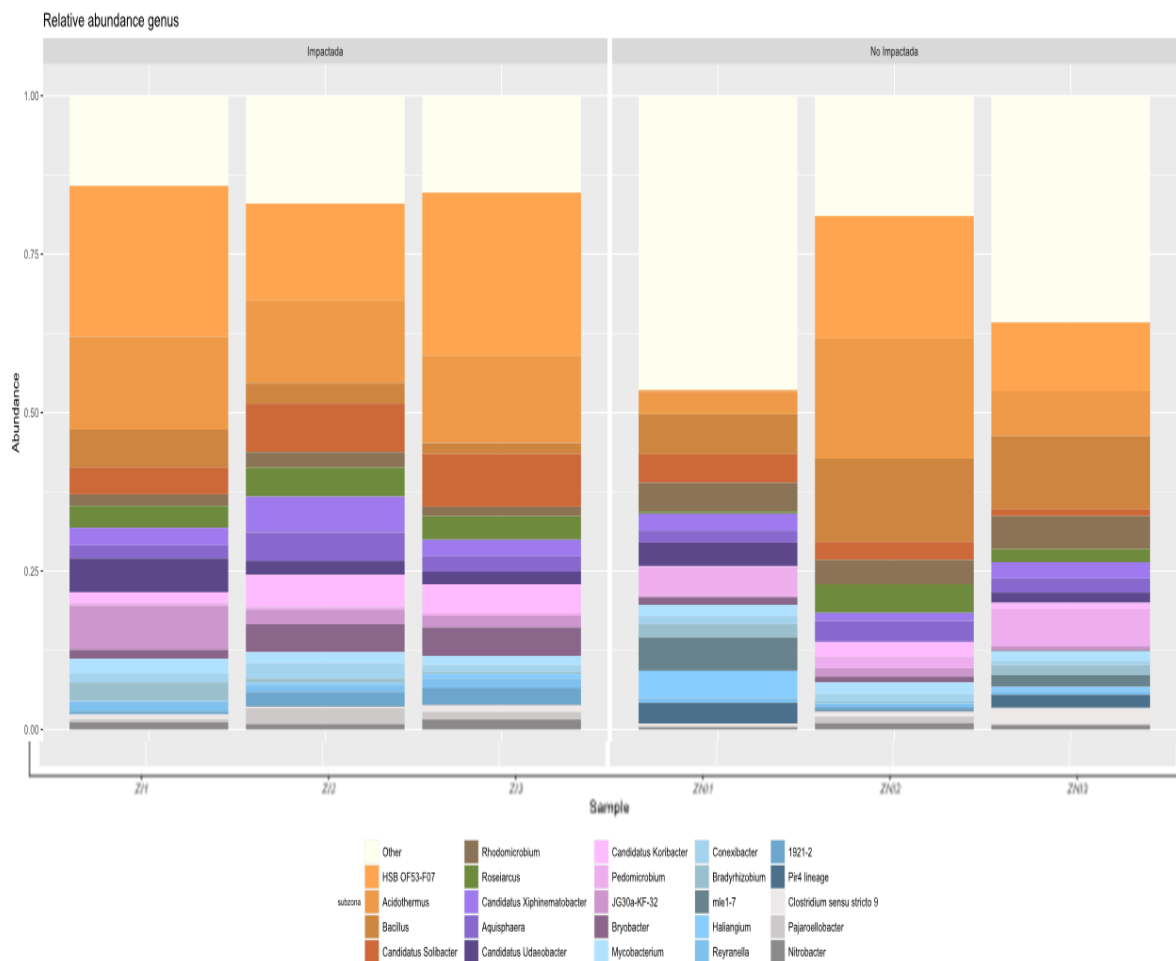
13	Bryobacter	0.000 ^a	0.056 ^d	0.166 ^e	0.993 ^e	1.000 ^e	0.993 ^e	0.991 ^e
14	Mycobacterium	0.567 ^e	0.989 ^e	0.769 ^e	0.978 ^e	0.986 ^e	1.000 ^e	0.999 ^e
15	Conexibacter	0.698 ^e	0.720 ^e	1.000 ^e	0.571 ^e	1.000 ^e	1.000 ^e	0.995 ^e
16	Bradyrhizo- bium	1.89e ⁻⁰⁷ ^a	0.008 ^b	0.000 ^a	0.840 ^e	0.066 ^d	1.000 ^e	0.103 ^e
17	mle1-7	0.201 ^d	1.000 ^e	1.000 ^e	1.000 ^e	0.000 ^a	0.000 ^a	0.010 ^b
18	Haliangium	0.004 ^b	0.981 ^e	0.855 ^e	0.997 ^e	0.000 ^a	0.000 ^a	0.885 ^e
19	Reyranella	0.005 ^b	0.982 ^e	0.998 ^e	1.000 ^e	1.000 ^e	1.000 ^e	1.000 ^e
20	1921-2	0.177 ^d	0.013 ^e	0.016 ^e	1.000 ^e	0.862 ^e	1.000 ^e	0.912 ^e
21	Clostridium sensu stricto 9	0.020 ^c	0.989 ^e	0.997 ^e	0.885 ^e	0.959 ^e	0.044 ^c	0.225 ^e
22	Pajaroelloba- cter	0.002 ^b	0.027 ^e	0.889 ^e	0.230 ^e	0.807 ^e	1.000 ^e	0.761 ^e
23	Nitrobacter	0.010 ^c	0.999 ^e	0.636 ^e	0.419 ^e	0.081 ^d	0.778 ^e	0.636 ^e

Rangos de significancia: ^a = 0 – 0.001; ^b = 0.002- 0.01; ^c = 0.02 - 0.05; ^d = 0.06 – 0.1; ^e = 0.2 – 1

Estas diferencias en la composición taxonómica de los géneros bacterianos en áreas con y sin impacto antropogénico, basándose en las abundancias relativas de las ASVs, se representaron en un gráfico de barras apiladas, en el cual el eje Y abarca un rango de 0 a 1, siendo 1 equivalente al 100% de las ASVs identificadas por zona. Además, en el bofedal de Pumacocha, se encontraron más géneros desconocidos en los suelos rizosféricos no afectados en comparación con aquellos impactados por la actividad antropogénica. (**Figura 14**).

Figura 14

Abundancias relativas de ASVs en las zonas con y sin impacto antrópico a nivel de género



Nota: Barras apiladas de la abundancia relativa de microorganismos a nivel de los 24 géneros más representativos de las zonas muestreadas no impactadas ZNI 1 (zona no impactada del área muestral 1: BNI 001, BNI002, BNI003, BNI004, BNI005), ZNI2 (zona no impactada del área muestral 2: BNI 006, BNI007, BNI008, BNI009, BNI010) y ZNI 3 (zona no impactada del área muestral 3: BNI 011, BNI012, BNI013, BNI014, BNI015) y zonas impactadas ZI1 (zona no impactada del área muestral 1: BI 001, BI002, BI003, BI004, BI005), ZI2 (zona no impactada del área muestral 2: BI 006, BI007, BI008, BI009, BI010) y ZI3 (zona no impactada del área muestral 3: BI011, BI012, BI013, BI014, BI015) por actividad antropogénica en los suelos rizosféricos.

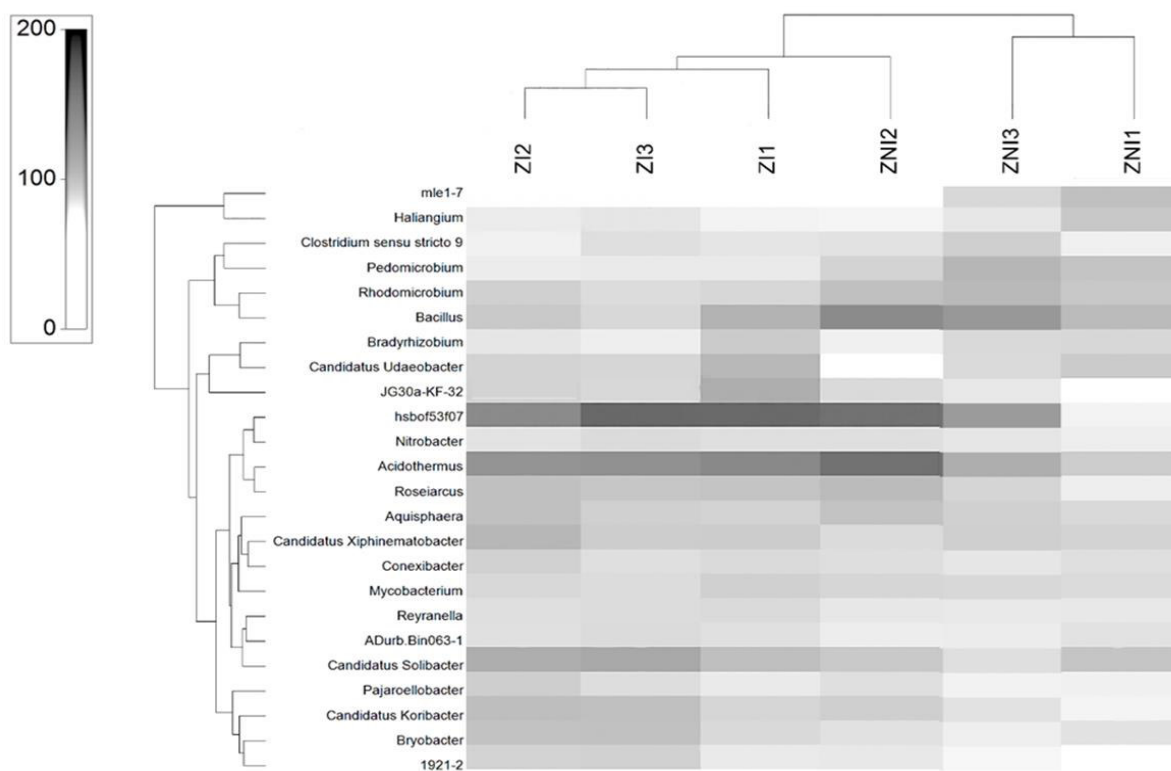
Mediante un mapa de calor se evaluó la estructura y composición bacteriana a nivel de género presentes en el suelo rizosférico influenciada por la actividad humana en las zonas impactadas (ZI 1, ZI 2 y ZI 3) y sin impacto (ZNI 1, ZNI 2 y ZNI 3) antropogénico.

En ella, se observó que en el suelo rizosférico de las zonas afectadas por la actividad humana, predominaron los géneros bacterianos como *Candidatus Solibacter*, *Roseiarcus*, *Candidatus Koribacter*, *JG30a-KF-32*, *Bryobacter*, *Bradyrhizobium*, *HSB OF 53-F07*, *Candidatus Xiphinematobacter*, *Candidatus Udaeobacter*, *Reyranella*, *Pajaroellobacter*, *Acidothermus* y *Nitrobacter*.

Por otro lado, en las zonas sin impacto antropogénico prevalecieron bacterias del género *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Bacillus*, *Haliangium* y *Clostridium sensu stricto 9* (Figura 15).

Figura 15

Mapa de calor de microorganismos presentes a nivel de géneros en los suelos impactados



Nota: Las etiquetas de las muestras BA equivalen al bofedal impactado. Gráfica obtenida con el software Primer v7. (BA1: zona impactada del área muestral 1; BA2: zona impactada del área muestral 2 y BA3: zona impactada del área muestral 3) por actividad antropogénica en los suelos rizosféricos.

Tabla 5

Predominancia de microorganismos rizosféricos de las zonas no impactadas por actividad antropogénica del bofedal de Pumacocha

Microorganismo	Taxon	Función ecológica	Referencias
Arqueas	Halobacteriota (a)	Producción de metano	(Pazinato, et al. 2010)
	Nanoarchaeota (a)	-	-
Bacterias	<i>Rhodomicrobium</i> (*)	Fotótrofa y psicotolerante	(Ramana, et al. 2013)
	<i>Pedomicrobium</i> (*)	Extremófilos terrestres	(Moore 1981; Wang, et al (2021)
	<i>Bacillus</i> (**)	Solubilizadoras de fosfato	(Ten et al, 2022)
	<i>Haliangium</i> (**)	Fotótrofa	(Bai et al. (2023)
	<i>Clostridium sensu stricto 9</i> (***)	Quimioorganotróficas	(Bai, et al. (2023)

(*): nivel de significancia elevada de 0 a 0.001

(**): nivel de significancia media de 0.001 a 0.01

(***): nivel de significancia baja de 0.01 a 0.05

(a): nuevo microorganismo reportado en suelos rizosféricos de bofedal

Tabla 6

Predominancia de microorganismos rizosféricos de las zonas impactadas por actividad antropogénica del bofedal de Pumacocha

Microorganismo	Taxon	Función ecológica	Referencias
Arqueas	Crenarchaeota (a)	Arqueas edáficas benéficas	(Lehtovirta, et al. 2009; Pazinato, et al. 2010)
	Micrarchaeota (a)	-	-
Bacterias	<i>Candidatus Solibacter</i> (*)	Desnitrificación Solubilizadoras de Mg y Fe	(Deng, et al. 2018; James, et al. 2022 y He, et al. 2023) (Castellano- Hinojosa, 2023)
	<i>Roseiarcus</i> (*)	Remediación de contaminantes	(Svetashev, 2020)
	<i>Candidatus</i> <i>Koribacter</i> (*)	Solubilizadoras de Mg y Fe Desnitrificante	(Castellano- Hinojosa, 2023) (He, et al. 2023)
	JG30a-KF-32 (*)	-	-
	<i>Bryobacter</i> (*)	Quimioorganotróficas Solubilizadoras de Mg y Fe Desnitrificante	(Bai, et al. (2023) (Castellano- Hinojosa, 2023) (He, et al. 2023)

<i>Bradyrhizobium</i> (*)	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	(Shahid, et al. 2023)
HSB OF 53-F07 (**)	-	-
<i>Candidatus Xiphinematobacter</i> (**)	Bacterias endosimbióticas del nemátodo patógeno <i>Xiphinema</i> .	(Palomares-Rius, 2017; Palomares-Rius, 2021)
<i>Candidatus Udaeobacter</i> (**)	Bacterias edáficas	(Willms, et al. 2020)
<i>Reyranella</i> (**)	Eliminación de gases traza	
<i>Pajaroellobacter</i> (**)	Patógeno intestinal de mamíferos murinos	(De, Mukhopadhyay & Dutta, 2020; Méndez-Pérez, et al. 2020)
<i>Acidothermus</i> (***)	Patógeno intracelular en mamíferos murinos	(Blanchard, et al. 2022)
<i>Nitrobacter</i> (***)	Acidófilas	(Zhang et al., 2018)
	Degradación de lignina, quitina y celulosa	
	Nitrificante	(Philippot, et al. 2013; Otu, et al. 2016)

(*): nivel de significancia elevada de 0 a 0.001

(**): nivel de significancia media de 0.001 a 0.01

(***): nivel de significancia baja de 0.01 a 0.05

(a): nuevo microorganismo reportado en suelos rizosféricos de bofedal

4.6. Análisis de diversidad microbiana

A partir del objeto Phyloseq, se llevó a cabo un análisis detallado de la diversidad microbiana presente en cada área de muestreo, incluyendo las zonas no impactadas (ZNI 1, ZNI 2 y ZNI 3) y las zonas impactadas por actividad antropogénica (ZI 1, ZI 2 y ZI 3).

Este análisis abordó tanto la diversidad alfa, que se refiere a la diversidad microbiana dentro de cada área de muestreo, como la diversidad beta, que evalúa las diferencias en la diversidad microbiana entre las áreas con y sin impacto antropogénico.

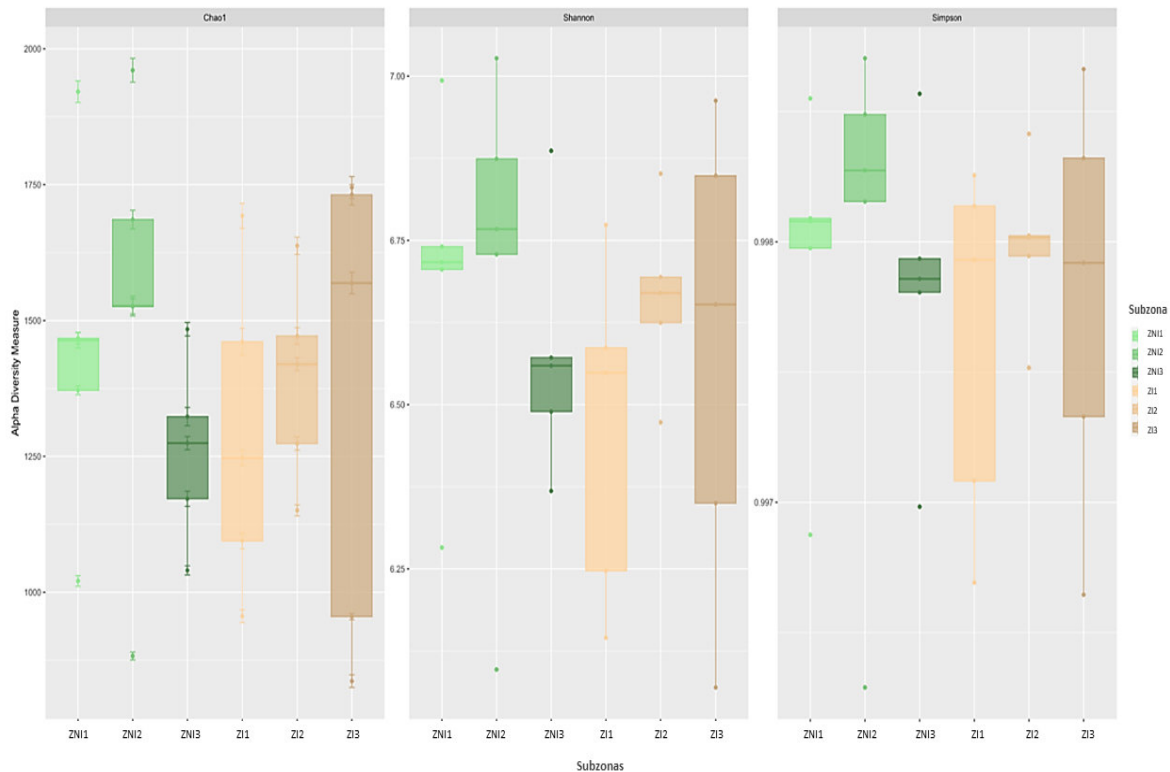
Para conocer la riqueza y homogeneidad de la diversidad bacteriana presente en cada una de las áreas de muestreo, se calculó el índice de Shannon (ZNI 1 = 6.73, ZNI 2 = 6.76, ZNI 3 = 6.58, ZI 1 = 6.54, ZI 2 = 6.66 y ZI 3 = 6.63); ello explicó que las zonas no impactadas, específicamente la ZNI 1 y ZNI 2, presentan una mayor riqueza y homogeneidad en la proporción de bacterias.

Así mismo, la diversidad de especies comunes y raras (índice de Chao) y la dominancia relativa de las especies presentes expresada en la probabilidad de encontrar dos bacterias elegidas al azar de una muestra que pertenezcan a diferentes especies (índice de Simpson) fue mayor en las zonas no impactadas respecto a las muestras de las zonas impactadas (**Figura 16**).

Estos resultados podrían sugerir que el impacto humano está reduciendo la diversidad de las comunidades bacterianas del suelo rizosférico del bofedal de Pumacocha.

Figura 16

Índices de diversidad alfa de cada zona con y sin impacto antropogénico

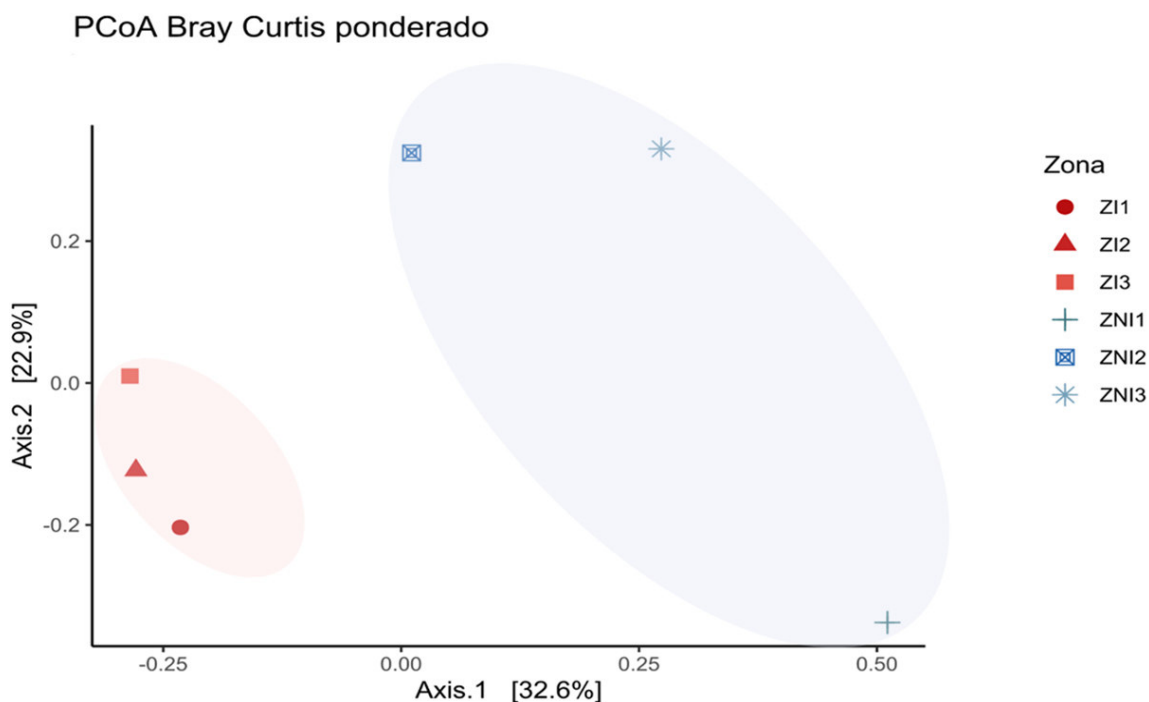


Nota: Índices de diversidad alfa de las bacterias pertenecientes a las zonas no impactadas (ZNI1: zona no impactada del área muestral 1; ZNI2: zona no impactada del área muestral 2 y ZNI3: zona no impactada del área muestral 3) y zonas impactadas (ZI1: zona no impactada del área muestral 1; ZI2: zona no impactada del área muestral 2 y ZI3: zona no impactada del área muestral 3) por actividad antropogénica en los suelos rizosféricos.

Mediante el índice de disimilitud de Bray-Curtis se analizó, con relación al impacto antropogénico, el grado de diferenciación entre las comunidades microbianas rizosféricas de los suelos; las zonas impactadas y no impactadas, en conjunto, son comunidades diferentes en función al grado de abundancia microbiana en ambas zonas de estudio (**Figura 17**).

Figura 17

Índices de diversidad beta de las zonas con y sin impacto antropogénico



Nota: Los puntos rojos representan a los 15 objetos de phyloseq bajo una estandarización y ordenamiento por Unifrac ponderado de los datos obtenidos por muestra de cada zona impactada. Los puntos azules representan a los 15 objetos de phyloseq bajo una estandarización y ordenamiento por Unifrac ponderado de los datos obtenidos por muestra de cada zona no impactada.

4.7. Correlación de variables fisicoquímicas y composición microbiana

Mediante el análisis de PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance, en inglés) se obtuvo un valor de significancia de 0.001 lo que indica que la composición bacteriana es significativamente diferente entre los suelos rizosféricos de las zonas impactadas y no impactadas por actividad antropogénica del bofedal en estudio; lo que podría indicar una posible contaminación microbiana en los grupos con valores más altos de materia orgánica (**Tabla 7**).

Tabla 7*Análisis de PERMANOVA de las variables ambientales*

Modelo	Relación	Zona (ZI - ZNI)
1	data_genus ~ Arena	0.061 ^d
2	data_genus ~ Limo	0.100 ^d
3	data_genus ~ MO	0.001 ^a
4	data_genus ~ Ca	0.067 ^d
5	data_genus ~ Mg	0.050 ^d
6	data_genus ~ Arena*Limo	0.364 ^e
7	data_genus ~ Arena* MO	0.136 ^e
8	data_genus ~ Arena* Ca	0.162 ^e
9	data_genus ~ Arena* Mg	0.151 ^e
10	data_genus ~ Limo * MO	0.249 ^e
11	data_genus ~ Limo * Ca	0.368 ^e
12	data_genus ~ Limo * Mg	0.168 ^e
13	data_genus ~ MO * Ca	0.201 ^e
14	data_genus ~ MO * Mg	0.080 ^d
15	data_genus ~ Ca * Mg	0.092 ^d
16	data_genus ~ Arena * Limo * MO	1 ^e
17	data_genus ~ Limo * Ca * Mg	1 ^e
18	data_genus ~ MO * Ca * Mg	1 ^e
19	data_genus ~ Arena * Limo * MO * Mg	1 ^e
20	d ata_genus ~ Arena * MO * Ca * Mg	1 ^e

Rangos de significancia: ^a = 0 – 0.001; ^b = 0.002- 0.01; ^c = 0.02 - 0.05; ^d = 0.06 – 0.1;

^e = 0.2 - 1

Se correlacionó los 24 géneros bacterianos más prevalentes (**ANEXO XI**), a partir de los 17850 ASVs obtenidos post rarefacción, con la metadata fisicoquímica mediante la gráfica de RDA (Análisis de Redundancia). En este, se interpretó las observaciones y las variables de respuesta con cosenos cuadrados altos (**Figura 18**) En esta gráfica se observó lo siguiente:

El suelo limoso y el % de cationes intercambiables a nivel de Al³⁺+H⁺ fue la composición fisicoquímica más prevalente en las zonas impactadas por actividad antropogénica, caracterizada por contener bacterias conocidas y desconocidas del género. Bacterias desconocidas como 1921-2, JG30a-KF-32 y ADurb.Bin063-1; y bacterias conocidas como *Nitrobacter*, *Aquisphaera*, *Mycobacterium*, *Candidatus Xiphinematobacter*, *Pajaroellobacter*, *Reyranella*, *Conexibacter*, *Roseiarcus*, *Candidatus Koribacter* y *Candidatus Solibacter*.

El % de materia orgánica, calcio, magnesio y el tipo de suelo arenoso fue la composición fisicoquímica más prevalente en las zonas no impactadas por actividad antropogénica, caracterizada por contener bacterias conocidas y desconocidas del género. Bacterias desconocidas como mle1-7; y bacterias conocidas como *Bradyrhizobium*, *Haliangium*, *Candidatus Udaeobacter*, *Clostridium sensu stricto* 9, *Pedomicrobium* y *Rhodomicrobium*.

Los resultados de la investigación sobre el bofedal de Pumacocha revelan varias observaciones importantes respecto a la composición del suelo y su relación con la actividad humana y la diversidad biológica. Durante la temporada seca, los suelos del bofedal de Pumacocha demostraron ser ácidos. Esta es una característica que puede influir en la composición de la flora y fauna del suelo.

En cuanto a la composición bacteriana, se encontraron diferencias entre las zonas impactadas y no impactadas por la actividad humana, específicamente por el pastoreo. Aunque las bacterias presentes en ambos tipos de zonas eran en su mayoría las mismas, había una abundancia relativa más alta de estos microorganismos en las zonas impactadas. Esto podría deberse a la presencia de heces de camélidos, que pueden aportar nutrientes adicionales al suelo que favorecen el crecimiento bacteriano.

Además, en las zonas no afectadas por el pastoreo, se observó una mayor diversidad de especies vegetales. Esto podría estar relacionado con el mayor porcentaje de materia orgánica, la conductividad eléctrica y los niveles de cationes intercambiables de Mg^{++} y Ca^{++} encontrados en estas áreas. Estos elementos son vitales para la salud del suelo y pueden contribuir a la mayor diversidad de plantas en las zonas no impactadas.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Presencia de especies vegetales en las zonas de estudio

Ambas zonas de estudio (no impactada e impactada) presentaron especies vegetales que conforman los colchones vegetales de los bofedales, tales como *Distichia muscoides*, *Oreobolus obtusangulus*, *Plantago rigida* y *Oxicloe andina* (Ministerio del Ambiente, 2019)

La especie vegetal *Werneria pygmaea*, presente en las zonas filtrantes del bofedal, sólo abundó en las zonas no impactadas, esto podría evidenciar una tolerancia a la época seca (Polk et al., 2019), contrariamente a lo obtenido por Loza et al. (2015), quienes encontraron que en los bofedales bolivianos *W. pygmaea* no toleró la falta de agua dentro del suelo durante la época seca debido al retroceso glacial que pudo afectar indirectamente la diversidad vegetal a través de cambios en las especies dominantes en este estudio.

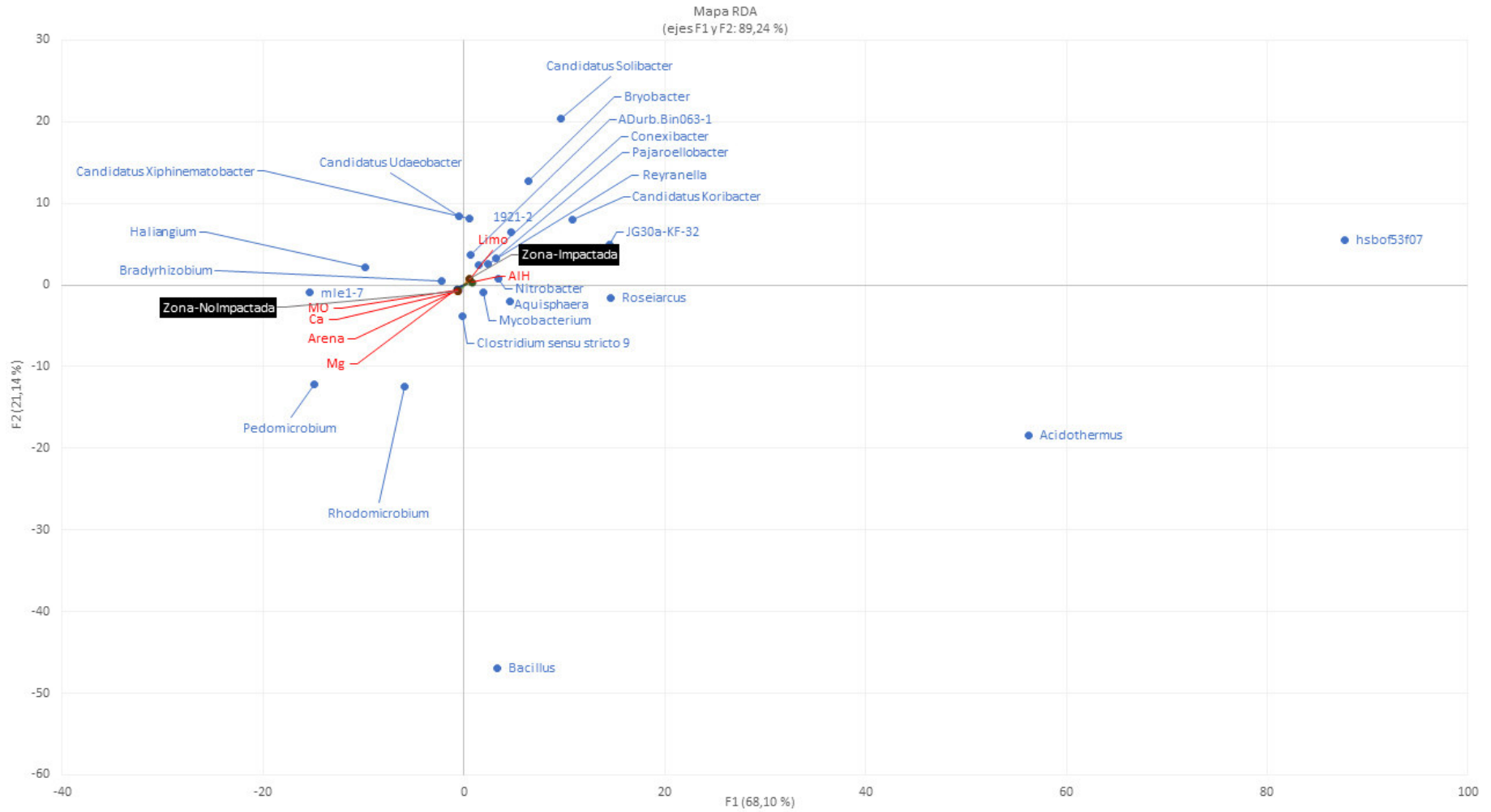
5.2. Diferencias fisicoquímicas en ambas zonas de estudio

En los humedales de la sierra altoandina, la presencia de rocas calcáreas como la caliza hace que los suelos sean desde ligeramente ácidos a básicos; siendo las turberas ácidas el resultado de la acumulación de materia orgánica debido a su descomposición microbiana lenta, las bajas temperaturas y a la falta de oxígeno, lo que conlleva a la predominancia de bacterias ácidas anoxigénicas (Gardi et al. 2014).

Los suelos sin impacto antropogénico mostraron un mayor porcentaje de materia orgánica, cationes de calcio, suelo arenoso y cationes de magnesio. La presencia de una mayor cantidad de materia orgánica se debe a una alta tasa de productividad primaria y una tasa reducida de descomposición anaeróbica (Sherman, et al. 2003).

Figura 18

Análisis de RDA: Correlación de la composición taxonómica con variables ambientales de los suelos rizosféricos



Así mismo, a una mayor presencia de especies vegetales con bacterias con un metabolismo lento pero activo contribuyendo a la resiliencia del suelo del bofedal en época seca (Gardi et al. 2014). No obstante, las turberas, en particular, acumulan cantidades significativas de materia orgánica del suelo cuando la producción de plantas excede la descomposición con el tiempo (Trettin, et al. 2020).

Por otro lado, el alto porcentaje de suelo limoso y cationes de Hidróxido de aluminio ($Al^{+3}+H^{+1}$) pareció determinar la composición de microorganismos de la zona impactada. Probablemente, debido a que estos cationes de $Al^{+3}+H^{+1}$ inmovilizan el fósforo disponible en el suelo, no dejándolo disponible para las bacterias solubilizadoras de fosfatos; sin embargo, en las zonas no impactadas en presencia abundante de Ca^{++} y Mg^{++} , los fosfatos quedarían disponibles en el suelo (Farfán y Farfán, 2012).

6. Diversidad microbiana rizosférica del bofedal de Pumacocha

Para predecir la composición bacteriana, las secuencias obtenidas en este estudio se compararon con la base de datos SILVA, teniendo como referencia un 97% de coincidencia, obteniéndose que 72% de las secuencias corresponden a organismos no identificados, no cultivados o desconocidos; 25%, a Géneros ya reportados y cerca del 2.5%, no coinciden con etiquetas del género porque excluyeron secuencias de cloroplasto y mitocondriales.

En este estudio, la predicción taxonómica bacteriana solo llegó hasta nivel de género debido a que la predicción no incluye los desajustes a nivel de especies que se encuentran en los datos de origen de NCBI GenBank (Pruesse et al., 2007; Quast et al., 2013, Robeson et al., 2021).

La estructura y composición de las comunidades bacterianas halladas en esta investigación pueden ser un buen indicador de la salud de los humedales o el estado de restauración durante la restauración natural. Investigaciones previas han indicado que la

composición de las comunidades microbianas, tanto arqueas como bacterias, del suelo en humedales puede variar como respuesta a alteraciones antropogénicas en las condiciones del suelo (Yang, et al. 2019; Gao, et al. 2021).

En los suelos rizosféricos de los humedales ácidos de Pumacocha, se identificaron arqueas cuyo papel es importante en la biogeoquímica del suelo y en la promoción del crecimiento de las plantas (Huang, et al. 2019).

En este estudio, también se identificaron bacterias presentes en la rizosfera cuyos filos prevalentes también fueron reportados por Deng, et al. (2017) quienes exploraron la diversidad microbiana en suelos de humedales en los pequeños montículos sobre el suelo (hummock, en inglés) y tres humedales en la meseta Qinghai-Tibet utilizando secuenciación de pirosecuenciación de 16S rRNA.

Cuyos filos bacterianos dominantes identificados en los humedales incluyeron Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Planctomycetes y Chloroflexi.

Así mismo, este estudio fue compatible con los hallazgos de Mandal, Singh & Panda (2019), quienes analizaron la composición y diversidad de la comunidad bacteriana en humedales ácidos impactados en East Calcutta en la India; donde los filos bacterianos más abundantes identificados en el estudio fueron Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Chloroflexi.

6.1. Diversidad microbiana rizosférica de zonas no impactadas

Los microorganismos encontrados con predominancia elevada en estos suelos rizosféricos sin presencia excesiva de heces y con mayor vegetación, se detallan a continuación:

Se identificaron arqueas con una predominancia alta fueron Haloarchaeota y Nanoarchaeota; no obstante, hay información limitada sobre el papel ecológico de las arqueas Halobacteriota en suelos de rizosfera de humedales ácidos. Hay investigaciones sobre la caracterización molecular de la comunidad arqueal en suelos de humedales del este de Amazonas y su papel en la producción de metano al cual estos filos arqueales pueden estar involucrados (Pazinato, et al. 2010).

Su producción de metano se logra a partir de la degradación de los residuos vegetales y otros materiales orgánicos que de otra manera podrían acumularse en el suelo. No obstante, de no ser asimilado el metano por otros microorganismos metanótrofos, podrían ser liberados al ambiente contribuyendo al calentamiento global (Jia-qi, et al. 2022).

Respecto a la diversidad bacteriana en estos suelos no impactados por actividad antropogénica, se identificó a 5 géneros con una predominancia elevada, cuya función ecológica se detalla a continuación:

Los estudios han demostrado que bacterias del género *Rhodomicrobium* son uno de los géneros bacterianos que puede enriquecerse significativamente en el suelo de la rizosfera de ciertas plantas en humedales (Ramana, et al. 2013; Hester, et al. 2018).

Así mismo, hay una especie de rodomicrobio que se ha identificado como una alfaproteobacteria fototrófica y presente en humedales de China (Ma, et al. 2022), que también fue aislada de una corriente de agua dulce con una característica adicional de ser psicotolerante es decir que son capaces de crecer y multiplicarse en condiciones de bajas temperaturas, generalmente entre -20°C y 10°C (Ramana, et al. 2013).

Las bacterias del género *Pedomicrobium* son un tipo de extremófilos terrestres que habitan principalmente en ambientes duros como las superficies rocosas del desierto, además de encontrarse en suelos, sistemas acuáticos y diversos sistemas acuáticos (Moore 1981).

Semejante a nuestros resultados hallados, Wang, et al (2021) en los humedales pantanosos del borde oriental de Qinghai-Tíbet en China, encontraron una comunidad bacteriana del suelo rizosférico dominado por *Pedomicrobium* entre otros géneros clave en las redes de interacción bacteriana. Así mismo, en esos humedales identificaron a *Rhizomicrobium*, *Geobacter* y *Nitrospira* que en comparación a nuestro estudio, no fueron las bacterias más representativas ni dominantes en los suelos rizosféricos del humedal de Pumacocha (Ancash – Perú).

Por otra parte, las bacterias encontradas con predominancia media en estos suelos rizosféricos sin presencia excesiva de heces y con mayor vegetación, se detallan a continuación:

Ten et al, 2022, caracterizaron bacterias solubilizadoras de fosfato de suelos rizosféricos del humedal de Yeyahu (Pekín, China) del género *Bacillus*, así como la especie patógena *B. cereus*.

En un humedal artificial o construido en China, según Bai, et al. (2023) en la rizosfera, la pérdida radial de oxígeno (ROL, en inglés) desempeña un papel clave en la actividad y abundancia de microorganismos funcionales. El alto nivel de ROL en la capa superior podría apoyar el suministro de oxígeno para las bacterias aerobias como *Haliangium*, facilitando la eliminación de la demanda química de oxígeno (60%) y $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (50%),

Las bacterias halladas con predominancia baja en estos suelos rizosféricos sin presencia excesiva de heces y con mayor vegetación, fueron del género *Clostridium sensu stricto*, que pertenecen a Firmicutes, se han descrito como un tipo de bacterias metabolizadoras de materia orgánica en los estudios anteriores (Wang et al., 2019; Xu et al., 2017).

6.2. Diversidad microbiana rizosférica de zonas impactadas

Los microorganismos encontrados en estos suelos rizosféricos con presencia excesiva de heces y con menor vegetación, se detallan a continuación:

Se identificaron arqueas con una predominancia alta fueron Crenarchaeota, Micrarchaeota. Crenarchaeota es un filo arqueal que está presente en el suelo, incluidos los suelos ácidos, y está regulada por el pH del suelo. Un estudio encontró que un grupo de Crenarchaeota representa una mayor proporción en suelos ácidos y puede tener una función ecológica importante en condiciones específicas. Otro estudio encontró que el 65% de las secuencias en la comunidad arqueal en una planta de humedales rizosfera pertenecían al filo Crenarchaeota (Lehtovirta, et al. 2009; Pazinato, et al. 2010).

Respecto a la diversidad bacteriana en estos suelos impactados por actividad antropogénica, se identificó a 6 géneros con una predominancia elevada, cuya función ecológica en estos suelos rizosféricos ácidos, se detalla a continuación:

Candidatus Solibacter es una bacteria que se encuentra en los suelos de la rizosfera de los humedales ácidos, y su presencia es importante para los procesos biogeoquímicos de estos suelos. Esta bacteria contribuye al ciclo de nutrientes y a la emisión de gases de efecto invernadero (Deng, et al. 2018; James, et al. 2022).

Además, *Candidatus Solibacter* puede llevar a cabo la oxidación anaeróbica de amonio o desnitrificación en suelos de humedales con bajo contenido de nutrientes y oxígeno (Zou, et al. 2022). Esta bacteria también proporciona condiciones ambientales beneficiosas para otras bacterias y fue reportada como uno de los principales organismos involucrados en el ciclo nutricional de los suelos ácidos en el noreste de Estados Unidos y Canadá (Li, et al. 2018; James, et al. 2022).

La presencia de *Roseiarcus* en suelos rizosféricos de bofedales es limitada; sin embargo, se ha identificado entre bacterias rizosféricas de plantas de tomate y berenjena en condiciones de invernadero en el sur de Rusia, cuya función ecológica estuvo implicada en la remediación de contaminantes en los suelos rizosféricos, así como en la mejora de la calidad del suelo (Svetashev, 2020).

Las bacterias del género *Bryobacter* son quimioorganotróficas, es decir, obtienen energía a partir de compuestos orgánicos (Integrated Taxonomic Information System (2002)). Se ha demostrado que *Bryobacter* es capaz de reducir nitrato, lo que favorece la acumulación de este compuesto en el suelo (He, et al. 2023); sin embargo, no se han reportado en suelos rizosféricos de humedales ácidos.

Se han encontrado que *Bryobacter*, *Candidatus Koribacter* y *Candidatus Solibacter*, son importantes y positivamente correlacionados con la concentración de Mg y Fe y disponibilidad en las raíces de las plantas (Castellano-Hinojosa, 2023). También se ha demostrado que *Bryobacter* tiene una relación negativa con NO₃-N en el suelo, lo que indica una disminución en la reducción de nitrato (He, et al. 2023).

Los PGPR o "rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal" en inglés, son microorganismos esenciales que desempeñan un papel importante en la mitigación de los efectos tóxicos de diferentes estresores ambientales en las plantas, como la salinidad, la sequía, los metales pesados y los contaminantes orgánicos. Las cepas de *Bradyrhizobium*, que son un tipo de PGPR y que producen la enzima ACC desaminasa, han demostrado ser altamente prometedoras al proporcionar resistencia y tolerancia a las plantas frente a diversos estresores, lo que las convierte en una opción ventajosa en comparación con otros microorganismos del suelo y microbiomas vegetales que pueden florecer en ambientes estresados (Shahid, et al. 2023).

Por otra parte, las bacterias encontradas con predominancia media en estos suelos rizosféricos sin presencia excesiva de heces y con mayor vegetación fueron los siguiente 5 géneros bacterianos, cuya función ecológica asociada a estos suelos rizosféricos ácidos, se detallan a continuación:

Los nematodos del género *Xiphinema* son conocidos por ser fitoparásitos y se encuentran en la rizosfera de muchas plantas, lo que significa que se alimentan de las raíces y pueden causar daños significativos a la planta (Palomares-Rius, 2020). Además, se ha observado que algunos nematodos del género *Xiphinema* pueden albergar bacterias endosimbióticas, como *Candidatus Xiphinematobacter*, cuya función en la interacción planta-nematodo no está completamente entendida (Palomares-Rius, 2017; Palomares-Rius, 2021).

En general, la presencia de *Xiphinema* en la rizosfera de las plantas puede tener implicaciones negativas para la salud y el crecimiento de la planta.

Los representantes de *Udaeobacter* se encuentran en los ecosistemas del suelo a nivel mundial (Brewer, et al. 2016). Los representantes de *Udaeobacter* pueden utilizar nutrientes que se liberan debido a la lisis impulsada por antibióticos de otros microbios del suelo y, por lo tanto, reducen la síntesis energéticamente costosa de las biomoléculas requeridas. *Candidatus Udaeobacter* se beneficia de la liberación de antibióticos en el suelo y puede eliminar gases traza (Willms, et al. 2020).

Respecto a la bacteria *Reyranella*, se ha identificado en muestras fecales diarreicas (De, et al. 2020), demostrando ser parte del microbioma intestinal patógeno de humanos, animales terrestres y acuáticos (Méndez-Pérez, et al. 2020); por ello, al no encontrarse reportes sobre la presencia de esta bacteria en suelos rizosféricos de humedales ácidos y tampoco en otro tipo de suelos rizosféricos, se infiere que esta bacteria posiblemente altere el equilibrio ecológico y la salud del suelo.

Según Brooks, et al. (2016) una especie representativa de *Pajaroellobacter*, *P. abortibovis*, estuvo presente en análisis citométrico de flujo en leucocitos murinos catalogándose como un patógeno bacteriano intracelular en murinos. Además, dicha especie, es causante del aborto epizoótico bovino (Blanchard, et al. 2022). Con ello podría deducirse que este género, es un patógeno de mamíferos más no es propio del microbioma del suelo rizosférico el cual podría alterarse en su presencia.

Las bacterias halladas con predominancia baja en estos suelos rizosféricos sin presencia excesiva de heces y con mayor vegetación, fueron bacterias actinobacterias como *Acidothermus*. Estas, son un grupo importante de microorganismos para el ciclo de nutrientes en el suelo, ya que contribuyen en la degradación de compuestos como la lignina, quitina y celulosa. Además, son capaces de producir enzimas que ayudan en la liberación de nutrientes importantes como carbono, fósforo, potasio (Zhang et al., 2018). Sin embargo, su alta prevalencia, puede ser debido a la elevada acidez y el tipo de suelo (Eisenlord & Zak, 2010; Duran et al., 2015), que en este estudio fue de naturaleza limosa.

También se identificaron a bacterias firmicutes como *Nitrobacter*. En los suelos ácidos rizosféricos, *Nitrobacter* podría presentar una relación simbiótica con las plantas. Además, se ha demostrado que la actividad de *Nitrobacter* podría aumentar en la rizosfera favoreciendo disponibilidad de nitrógeno para las plantas, y puede ser especialmente relevante en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes manteniendo fértil el suelo (Philippot, et al. 2013; Otu, et al. 2016).

De hecho, estudios han demostrado que la presencia de enzimas como la ureasa, catalasa y fosfatasa ácida se correlacionan positivamente y de manera significativa con muchos géneros bacterianos importantes, como *Acidothermus* y *Bacillus* que degradan lignina, quitina y celulosa (Khan, et al. 2022).

En aspectos generales, respecto a la función ecológica microbiana, la presencia de 9 géneros bacterianos restauradoras de suelos como *Candidatus Solibacter*, *Roseiarcus*, *Candidatus Koribacter*, *Bryobacter*, *Bradyrhizobium*, *Candidatus Udaeobacter*, *Reyranella*, *Acidothermus* y *Nitrobacter* fueron prevalentes en las zonas con mayor presencia de heces de camélidos y poca vegetación podría explicar la adaptabilidad y sobreactividad de estos microorganismos rizosféricos ante la presencia de heces y poca vegetación. La presencia de bacterias patógenas de mamíferos como *Candidatus Xiphinematobacter* y *Pajaroellobacter*, manifiesta que en estos suelos probablemente se esté presentando una disbiosis microbiana (**Tabla 5**) (Cangioli et al., 2022).

Finalmente, para futuros estudios de restauración de suelos rizosféricos alterados por actividad antropogénica como el sobrepastoreo de camélidos o la extracción vegetal no controlada de la turba en los bofedales de Pumacocha, se plantea como candidatos microbianos a bacterias del género *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Bacillus*, *Haliangium*, *Clostridium sensu stricto* 9, *Candidatus Solibacter*, *Roseiarcus*, *Candidatus Koribacter*, *Bryobacter*, *Bradyrhizobium*, *Candidatus Udaeobacter*, *Reyranella*, *Acidothermus* y *Nitrobacter* (**Tabla 6**).

La diversidad obtenida en este estudio corresponde al suelo rizosférico superficial (muestreo realizado a una profundidad de 20 cm). Sin embargo, a niveles superficiales hay un mayor contenido de nutrientes debido a la eliminación de la materia orgánica de la planta y los exudados de raíz, lo que favorece la alta biomasa microbiana y la diversidad grupos bacterianos copitróficos. Sin embargo, próximos estudios deben considerar muestras a nivel de subsuelo, ya que a profundidades mayores a 30 cm se registran condiciones más extremas y pobres en nutrientes que favorece el crecimiento de arqueas y bacterias resistentes al estrés (Naylor et al., 2022).

La poca cantidad de estudios utilizando técnicas dependientes de cultivos para caracterizar la comunidad microbiana en ecosistemas de bofedales andinos, explicaría la alta cantidad de especies sin identificar obtenidos en este estudio. Por otro lado, la presencia de bacterias en estado viable pero no cultivable (VBNC, en inglés) (Xu et al. 1982) puede ser otra de las causas de la alta prevalencia de bacterias desconocidas en los suelos rizosféricos de las zonas no impactadas del bofedal (sin presencia de heces de camélidos y una mayor cobertura vegetal). Las VBNC entran a un estado de latencia en respuesta al hambre o al estrés citotóxico cuando sus poblaciones son bajas (De la Peña et al., 2022).

Posteriores estudios pueden evaluar la presencia de bacterias VBNC en zonas no impactadas del bofedal mediante métodos de microscopía de fluorescencia (Fakruddin et al., 2013), detección de actividades metabólicas y respiratorias (Oliver 2010, Ramamurthy et al., 2014, Zhao et al., 2017), y métodos moleculares para identificar genes funcionales para poder (Oliver, 2005; Oliver, 2010; Li et al., 2014) a fin de determinar su influencia la resiliencia del bofedal.

VI. CONCLUSIONES

- Los mayores niveles de materia orgánica y conductividad eléctrica en la zona no impactada podrían estar relacionados con la abundancia de especies vegetales y bacterias oligotrofas en las zonas no impactadas; no obstante, el estado ácido del bofedal condiciona la prevalencia de bacterias acidófilas en ambas zonas.
- Existen diferencias significativas en la diversidad microbiana rizosférica entre las zonas con y sin impacto antropogénico del bofedal de Pumacocha, Ancash (Perú).
- En los suelos rizosféricos de zonas con impacto antropogénico predominaron 13 bacterias restauradoras y dos bacterias patógenas de mamíferos (*Candidatus Xiphinematobacter* y *Pajaroellobacter*). En los suelos rizosféricos sin impacto, predominaron 5 bacterias indicadoras de salud edáfica.
- Las bacterias candidatas para futuros estudios de restauración son según prevalencia *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Bacillus*, *Haliangium*, *Clostridium sensu stricto* 9, *Candidatus Solibacter*, *Roseiarcus*, *Candidatus Koribacter*, *Bryobacter*, *Bradyrhizobium*, *Candidatus Udaeobacter*, *Reyranella*, *Acidothermus* y *Nitrobacter*.

VII. RECOMENDACIONES

- Para próximos estudios de metabarcoding de DNA en suelos de bofedales andinos, se recomienda realizar la toma de muestras a nivel de suelo y subsuelo (profundidad de 20 y 40 cm, respectivamente) a fin de ubicar bacterias resilientes. También se recomienda realizar un estudio estacional, ya que tener muestreos en varias épocas del año permitirá obtener una mejor representación de la diversidad microbiana y definir si los suelos ácidos se presentan durante todo el año por ser un bofedal de cordillera.
- Se sugiere realizar estudios de metabarcoding junto a estudios de metagenómica, a fin de encontrar genes funcionales en las comunidades microbianas que se identifiquen; ya que éstas involucran a bacterias viables conocidas y desconocidas sean o no cultivables en el laboratorio; que guardan un potencial aplicativo para futuros estudios de reforestación en los suelos del bofedal de Pumacocha (Ancash – Perú).
- Se recomienda diseñar e implementar el biomonitoreo de la diversidad microbiana rizosférica de los suelos del bofedal de Pumacocha mediante metabarcoding de DNA para i) conocer, en primera instancia, la situación de la comunidad bacteriana de la zona de estudio, en vista de que expresa mayor resolución taxonómica en menor tiempo que las técnicas tradicionales y ii) para identificar a las especies de interés con potencial para restauración ecológica.

VIII. REFERENCIAS

- Abou, M. N. I. & Ottow, J. C. G. (1985). Effect of increasing oxygen concentration on total denitrification and nitrous oxide release from soil by different bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 1:31–38
- Addinsoft (2022). XLSTAT statistical and data analysis solution. <https://www.xlstat.com>
- Adler, P. B. & Morales, J. M. (1999). Influence of environmental factors and sheep grazing on an Andean grassland. *Journal of Range Management*, 52, 471–481.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143–169. <http://10.1128/mr.59.1.143-169.1995>
- Armstrong, W. (1978). Root aeration in the wetland condition. Plant Life in Anaerobic Environments, eds D. D. Hook, and R. M. M. Crawford. *Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers*, 269–297.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E. Subramanian, S. & Smith, D. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*. 9:1473. <http://10.3389/fpls.2018.01473>
- Bai, Chen, Guo, Ren & Zhao (2023). Vertical-scale spatial influence of radial oxygen loss on rhizosphere microbial community in constructed wetland. *Environment International*. 171: 107690. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107690>
- Bardgett, R. D., Freeman, C. & Ostle, N. J. (2008). Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *ISME Journal*. 2:805. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.58>

- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*, 17:478–486. <http://10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Blanchard, Teglas, Anderson, Moore, McNabb, Collins, Yeargan & Stott (2022). Protection of Cattle against Epizootic Bovine Abortion (EBA) Using a Live *Pajaroellobacter abortibovis* Vaccine. *Vaccines (Basel)*, 10(2):335. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020335>
- Blanco, D. E. y V. M. de la Balze. (2004). Los Turbales de la Patagonia: Bases para su inventario y la conservación de su biodiversidad. *Wetlands International*, 19.
- Brewer, T., Handley, K., Carini, P., Gilbert, A. & Fierer N. (2017). Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium ‘*Candidatus Udaeobacter copiosus*’. *Nature Microbiology*, 2, 16198. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.198>
- Brooks, Blanchard, Clothier, Fish, Anderson & Stott (2016). Characterization of *Pajaroellobacter abortibovis*, the etiologic agent of epizootic bovine abortion. *Veterinary Microbiology*, 192, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.001>
- Bodelier, P. L., & Dedysh, S. N. (2013). Microbiology of wetlands. *Frontiers in microbiology*, 4:79. <http://10.3389/fmicb.2013.00079>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37: 852–857. <http://10.1038/s41587-019-0209-9>

- Braun, B. Richert, I. & Szewzyk, U. (2009). Detection of iron-depositing *Pedomicrobium* species in native biofilms from the Odertal National Park by a new, specific FISH probe. *Journal of Microbiological Methods*, 79: 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.07.014>
- Brown, D. J., Faria, A., Lamberti, F., Halbrendt, J. M., Agostinelli, A. & Jones, T. (1992). A DESCRIPTION OF *XIPHINEMA MADEIRENSE SP. N.* AND THE OCCURRENCE AND VIRUS VECTOR POTENTIAL OF *X. DIVERSICAUDATUM* (NEMATODA: DORYLAIMIDA) FROM SANTAN, MADEIRA. *Nematologia mediterránea*, 20: 251-259.
- Bull, A. T., & D. J. Hardman. (1991). Microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*. 2:421–428
- Castellano-Hinojosa, Albrecht & Strauss. (2023). Interactions between rootstocks and compost influence the active rhizosphere bacterial communities in citrus. *Microbiome*, 11, 79. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01524-y>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11, 2639–2643. <http://10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581–583. <http://10.1038/nmeth.3869>
- Cangioli, L., Salobehaj, M., Del Duca, S., Fagorzi, C., Berardi, C., Coppini, E., Fibbi, D., Fani, R. & Vassallo, A. (2022). Effect of Wastewater on the Composition of Bacterial Microbiota of *Phragmites australis* Used in Constructed Wetlands for Phytodepuration, *Plants*, 11: 3210. <https://doi.org/10.3390/plants1123321>

- Caporaso, J. C., Lauber, L.C., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L, Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G. & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6, 1621–1624 (2012). <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Caruso, R., Ono, M., Bunker, M. E., Núñez, G., & Inohara, N. (2019). Dynamic and Asymmetric Changes of the Microbial Communities after Cohousing in Laboratory Mice. *Cell Reports*, 27(11): 3401–3412.e3. <http://10.1016/j.celrep.2019.05.042>
- Chandra P. & Singh D. P. (2014). Removal of Cr (VI) by a halotolerant bacterium *Halomonas* sp. CSB 5 isolated from Sāmbhar salt lake, Rajasthan (India). *Cellular and Molecular Biology*, 60:64–72.
- Chandra P. & Singh E. (2016). Applications and Mechanisms of Plant Growth-Stimulating Rhizobacteria. (eds) *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore. http://10.1007/978-981-10-2854-0_3
- Chandra, P., & Enespa. (2019). Mycoremediation of Environmental Pollutants from Contaminated Soil. *Mycorrhizosphere and Pedogenesis*, 239–274. http://10.1007/978-981-13-6480-8_15
- Chapuis-Lardy, L., Wrage, N., Metay, A., Chotte, J. L. & Bernoux, M. (2007). Soils, a sink for N₂O? A review. *Global Change Biology*, 13:1–7.
- Cheng, F., Hou, L., Woeste, K., Shang, Z., Peng, X., Zhao, P., & Zhang, S. (2016). Soil pretreatment and fast cell lysis for direct polymerase chain reaction from forest soils for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of fungal communities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 817–827. <http://10.1016/j.bjm.2016.06.007>

- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic acids research*, 44(D1), D67–D72. <http://10.1093/nar/gkv1276>
- Cobo-Díaz, J. F., Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Robles, A. B., Toro, N., & Fernández-López, M. (2015). Metagenomic Assessment of the Potential Microbial Nitrogen Pathways in the Rhizosphere of a Mediterranean Forest After a Wildfire. *Microbial Ecology*, 69(4), 895–904. <http://10.1007/s00248-015-0586-7>
- Colmer, T. D. (2003). Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell & Environment*, 26, 17–36.
- Community Ecology Package (2022). R package vegan version 2.6-2. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (Revisado el 17 de noviembre del 2022)
- Ley N °. 28611. Ley General del Ambiente. *Diario Oficial El Peruano*. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/per81742.pdf>
- Daryadel & Talaei. (2014). Analytical Study on Threats to Wetland Ecosystems and their Solutions in the Framework of the Ramsar Convention International. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 8(7).
- Dedysh, S. N. (2011). Cultivating uncultured bacteria from northern wetlands: knowledge gained and remaining gaps. *Frontiers in Microbiology*. 2:184. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00184>
- Dedysh (2019). Bryobacter. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–5. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01667>
- De Mandal, S. & Bhatt, P. (2020). *Recent Advancements in Microbial Diversity*. Academic Press. <http://10.1016/C2019-0-01901-2>

- De, Mukhopadhyay & Dutta (2020). Metagenomic analysis of gut microbiome and resistome of diarrheal fecal samples from Kolkata, India, reveals the core and variable microbiota including signatures of microbial dark matter. *Gut Pathogens*, 12:32. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00371-8>
- Deng, Cui, Hernández & Dumont (2017). Microbial diversity in hummock and hollow soils of three wetlands on the Qinghai-Tibetan Plateau revealed by 16S rRNA pyrosequencing. *PloS One*, 12(7), e0181670. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103115>
- Deng, Cui, Hernández & Dumont (2018). The impact of land-use change on the energy balance of a rural area in the Argentine Pampas. *Geoderma*, 332, 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.016>
- De la Peña, D.A., Romo, A., Rios, C. Olivas, G. I., Ornelas, J. & Acosta, C. H. (2022). Primary inoculum of *Erwinia amylovora*: alternative sources and viable but non-culturable state: A review. *Journal of Plant Diseases and Protection*. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00674-9>
- Delavaux, C. S., Bever, J. D., Karppinen, E. M., & Bainard, L. D. (2020). Keeping it cool: Soil sample cold pack storage and DNA shipment up to 1 month does not impact metabarcoding results. *Ecology and Evolution*, 10(11), 4652–4664. <https://doi.org/10.1002/ece3.6219>
- Degrune, F., Theodorakopoulos, N., Colinet, G., Hiel, M.-P., Bodson, B., Taminau, B., Georges Daube, G., Vandenberg, M. & Hartmann, M. (2017). Temporal Dynamics of Soil Microbial Communities below the Seedbed under Two Contrasting Tillage Regimes. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01127>
- Delmont, T. O., Eren, A. M., Maccario, L., Prestat, E., Esen, Ö. C., Pelletier, E., Le Paslier, D., Simonet, P., & Vogel, T. M. (2015). Reconstructing rare soil microbial genomes using

- in situ enrichments and metagenomics. *Frontiers in microbiology*, 6, 358. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00358>
- Donaire, K., Perez, A., Romero, D. X., Cárdenas, O. & Álvarez, M. T. (2017). Establecimiento y evaluación de dos métodos de pre tratamiento de muestras de suelo para la extracción de DNA para el estudio de la diversidad bacteriana. *CON-CIENCIA*, 5(1), 27-38.
- Dopheide, A., Xie, D., Buckley, T. R., Drummond, A. J., & Newcomb, R. D. (2018). Impacts of DNA extraction and PCR on DNA metabarcoding estimates of soil biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.13086>
- Duran, Bielen, Paradzik, Gassie, Pustijanac, Cagnon & Vujaklija (2015). Exploring Actinobacteria assemblages in coastal marine sediments under contrasted Human influences in the West Istria Sea, Croatia. *Environmental Science and Pollution Research*. 22:15215–15229. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4240-1>
- Eisenlord & Zak (2010). Simulated atmospheric nitrogen deposition alters actinobacterial community composition in forest soils. *Journal of the Soil Science Society of America*, 74: 1157–1166. <https://doi.org/10.2136/sssaj2009.0240>
- Fakruddin, M., Bin Mannan, K. S. & Andrews, S. (2013). Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *International Scholarly Research Network Microbiology*, 3:1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/703813>
- Farfán, R. y Farfán E. (2012). Producción de Pasturas Cultivadas y Manejo de Pastos Naturales Altoandinos. *INIA-Gobierno Regional de Moquegua*, 61 pp.
- Figueroa K., Perez A., Romero D., Cárdenas O. y Álvarez M. (2017). Establecimiento y evaluación de dos métodos de pre tratamiento de muestras de suelo para la extracción de ADN para el estudio de la diversidad bacteriana. *CON-CIENCIA*, 5(1), 27-38.

- Fisher C K & Mehta P. (2014). Identifying keystone species in the human gut microbiome from metagenomic timeseries using sparse linear regression. *PLoS ONE*. 9: e102451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102451>
- Flórez, A. (2005). Manual de Pastos y Forrajes Altoandinos. ITDG AL, *OIKOS*, 53.
- Foulon, J., Zappellini, C., Durand, A., Valot, B., Girardclos, O., Blaudez, D., & Chalot, M. (2016). Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. *Science of The Total Environment*, 571: 1230–1240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.151>
- Francioli, D., Lentendu, G., Lewin, S., & Kolb, S. (2021). DNA Metabarcoding for the Characterization of Terrestrial Microbiota-Pitfalls and Solutions. *Microorganisms*, 9(2), 361. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361>
- Fricker, A. M., Podlesny, D. & Fricke, W. F. (2019). What is New and Relevant for Sequencing-Based Microbiome Research? A Mini-Review. *Journal of Advanced Research*, 19:105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.006>
- Gao, Liu, Shi, Liu, Duan, Lv, Bohu, Li, Hu, Wang, Zhuang (2021). Disentangling Responses of the Subsurface Microbiome to Wetland Status and Implications for Indicating Ecosystem Functions. *Microorganisms*, 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020211>
- Gardi, C., Angelini, M., Barceló, S., Comerma, J., Cruz-Gaistardo, J., Encina Rojas, A., Jones, A., Krasilnikov, P., Mendonça, M. F., Montanarella, L., Muñoz Ugarte, O., Schad, P., Vara Rodríguez, M. I. y Vargas, R. (2014). Atlas de suelos de América Latina y el Caribe. *Unión Europea*, L-2995.

- Getzke, F., Thiergart, T., Hacquard, S. (2019). Contribution of bacterial-fungal balance to plant and animal health. *Current Opinion in Microbiology*, 49:66–72. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.009>
- Guo J. H, Qi, H. Y, Guo, Y. H, Ge, H. L, Gong, L. Y. & Zhang, L. X. (2004). Biocontrol of tomato wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 29:66–72. [http://10.1016/S1049-9644\(03\)00124-5](http://10.1016/S1049-9644(03)00124-5)
- Hartman, Richardson, Vilgalys & Bruland (2008). Environmental and Anthropogenic Controls Over Bacterial Communities in Wetland Soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105, 17842–17847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808254105>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). *Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review*. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- He, Zhong, Xia, Xu, Zeng, Yang & Fan (2023). Long-Term Nitrogen Addition Exerts Minor Effects on Microbial Community but Alters Sensitive Microbial Species in a Subtropical Natural Forest. *Forests*, 14(5):928. <https://doi.org/10.3390/f14050928>
- Hester, Harpenslager, Van Diggelen, Lamers, Jetten, Lüke, Lückner, Welte. Linking (2018). Nitrogen Load to the Structure and Function of Wetland Soil and Rhizosphere Microbial Communities. *mSystems*, 3(1):e00214-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00214-17>
- Hofstede, R. y Aguirre, N. (1999). Biomasa y dinámica del carbono en relación con las actividades forestales en la Sierra del Ecuador. *Abya Yala, Páramo* (1).
- Hong Y., Liao D., Hu A., Wang H., Chen J., Khan S., Su J., Li H. (2015). Diversity of endophytic and rhizoplane bacterial communities associated with exotic *Spartina*

- alterniflora and native mangrove using Illumina amplicon sequencing. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(10): 723–733. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0079>
- Huang, Zhan, Bhatt & Chen (2019). Paraquat Degradation From Contaminated Environments: Current Achievements and Perspectives. *Frontiers Microbiology*, 10:1754. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01754>
- Integrated Taxonomic Information System (2002). Bryobacter. *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=956862#nul
- Ipenza, C.A. (2010). El Convenio sobre la Diversidad Biológica en el Perú - Análisis de su aplicación y avances en el Perú. *Ministerio del Ambiente (MINAM)*. https://biblioteca.spda.org.pe/biblioteca/catalogo/_data/20201014200347_EI%20Conv%20sobre%20DB.pdf
- Iturbe-Espinoza, P., Brandt, B. W., Braster, M., Bonte, M., Brown, D. M., & van Spanning, R. J. M. (2021). Effects of DNA preservation solution and DNA extraction methods on microbial community profiling of soil. *Folia Microbiologica*. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00866-0>
- Jackson, C. R., & Pringle, C. M. (2010). Ecological Benefits of Reduced Hydrologic Connectivity in Intensively Developed Landscapes. *BioScience*, 60(1), 37–46. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.1.8>
- James, Farrisi, Shah, S. & Shah, V. (2022). Identification of major organisms involved in nutritional ecosystem in the acidic soil from Pennsylvania, USA. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 1748439. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.1748439>

- Jia-qi, Wei-qi, Li-dong, Yu-ling, Jiang-bing, Mao-hui, Xin, Wang-ting, Jing-hao, Hong-sheng. (2022). Response of methanotrophic activity and community structure to plant invasion in China's coastal wetlands. *Geoderma*, 407:115569. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115569>
- Jurburg, S. D., Shek, K. L. & Mcguire, K., (2020). Soil microbial composition varies in response to coffee agroecosystem management. *FEMS Microbiology Ecology*. 96. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa164>
- Khan, Jiang, Bu, DNAan, Gillani, Hussain & Zhang (2022). Untangling the Rhizosphere Bacterial Community Composition and Response of Soil Physiochemical Properties to Different Nitrogen Applications in Sugarcane Field. *Frontiers Microbiology*. 13:856078. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.856078>
- Kulichevskaya, I. S., Danilova, O. V., Tereshina, V. M., Kevbrin, V. V. & Dedysh S. N. (2014). *Roseiarcus fermentans* gen. nov. sp. nov., a Bacteriochlorophyll a - Containing Fermentative Bacterium Phylogenetically Related to Alphaproteobacterial Methanotrophs and Description of the Family Roseiarcaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)* <https://doi.org/10.1099/ijss.0.064576-0>
- Laan, P., Berrevoets, M. J., Lythe, S., Armstrong, W., & Blom, C. W. P. M. (1989). Root morphology and aerenchyma formation as indicators of the flood-tolerance of *Rumex* species. *Journal of Ecology*. 77, 693–703. <https://doi.org/10.2307/2260979>
- Lehtovirta, Prosser & Graeme (2009). Soil pH regulates the abundance and diversity of Group 1.1c Crenarchaeota, *FEMS Microbiology Ecology*, 70: 367–376. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00748.x>

- León, B. et al. (2006). El Libro Rojo de las plantas endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), 13(2). <https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v13n2/contenido.html>
- Li, Mendis, N. Trigui, H., Oliver, J. D. & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5:258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Li, Liu, Wang, Jin, Song, Liang, Cao & Müller (2018). Influence of Altered Microbes on Soil Organic Carbon Availability in Karst Agricultural Soils Contaminated by Pb-Zn Tailings. *Frontiers Microbiology*, 9:2062. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02062>
- Loza S., Meneses, R., & Anthelme, F. (2015). Comunidades vegetales de los bofedales de la Cordillera Real (Bolivia) bajo el calentamiento global. *Ecología en Bolivia*, 50(1): 39-56.
- Lv, X., Yu, J., Fu, Y., Ma, B., Qu, F., Ning, K., & Wu, H. (2014). A Meta-Analysis of the Bacterial and Archaeal Diversity Observed in Wetland Soils. *The Scientific World Journal*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/437684>
- Ma, Fang, Liu, Yang, Lyu, Wang, Zhou, Dou & Zhang (2022). Differences in sediment carbon-fixation rate and associated bacterial communities in four wetland types in Hulun Lake Basin. *CATENA*, 213:106167. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2022.106167>
- Maldonado, M.S. (2010). Comportamiento De La Vegetacion De Bofedales Influenciados Por Actividades Antropicas. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Católica del Perú, 119 pp. <https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/7400>
- Mandal, Singh, & Panda (2019). Assessment of bacterial community composition and diversity in acid-impacted wetlands of East Calcutta Wetlands, India. *Environmental Science and*

Pollution Research, 26(14), 13909-13920. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05095-5>

Mamani, G. (2016). Ecología de los humedales altoandinos del Norte de ayacucho y Sur de Huancavelica, Perú. <https://gmmpastizales.blogspot.com/2016/06/ecologia-de-los-humedalesaltoandinos.html>

Mango, B.C. (2017). *VALORACIÓN ECONÓMICA DE LOS SERVICIOS ECOSISTÉMICOS DE REGULACIÓN, DE LOS BOFEDALES DEL CENTRO POBLADO DE CHALHUANCA, DISTRITO DE YANQUE, PROVINCIA DE CAYLLOMA, REGIÓN AREQUIPA*. Tesis de pregrado. Universidad San Agustín de Arequipa, Perú. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/4697/ECmamabc.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G., & Catroux, G. (2001). DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and environmental microbiology*, 67(5), 2354–2359. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001>

Méndez-Pérez, García-López, Bautista-López, Vázquez-Castellanos, Alvarez-González, Peña-Marín, Baltierra-Trejo, Adams-Schroeder, Domínguez-Rodríguez, Melgar-Valdés, Martínez-García, Moya & Gómez-Cruz (2020). High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene to analyze the gut microbiome in juvenile and adult tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Latin american journal of aquatic research*, 48(3), 456-479. <https://dx.doi.org/10.3856/vol48-issue3-fulltext-2419>

Ministerio del Ambiente. (2015). Mapa nacional de cobertura vegetal: memoria descriptiva. Dirección General de Evaluación, Valoración y Financiamiento del Patrimonio Natural.

Ministerio del Ambiente. <https://www.gob.pe/institucion/minam/informes-publicaciones/2674-mapa-nacional-de-cobertura-vegetal-memoria-descriptiva>

Ministerio del Ambiente. (2019). Guía de evaluación del estado del ecosistema de bofedal.

Ministerio del Ambiente, 55 pp. <https://sinia.minam.gob.pe/download/file/fid/65954>

Ministerio del Ambiente. (2019). MAPA NACIONAL DE ECOSISTEMAS DEL PERÚ:

Memoria descriptiva. *Biblioteca Nacional del Perú.*

<https://siar.regioncajamarca.gob.pe/documentos/mapa-nacional-ecosistemas-peru>

Ministerio del Ambiente. (2020). APRUEBAN DISPOSICIONES GENERALES PARA LA GESTIÓN MULTISECTORIAL Y DESCENTRALIZADA DE LOS HUMEDALES.

Diario Oficial El Peruano.

Ministerio del Ambiente (2021). Esto es lo que se debe conocer sobre las turberas.

<https://www.gob.pe/institucion/minam/noticias/504890-esto-es-lo-que-debes-conocer-sobre-las-turberas>

Mohan, S., & Tippa, A. (2019). *Role of Wetland Soil Bacteria in Enhancing the Phytoremediation Process through Bioavailability Phenomenon.* Environmental.

World Environmental and Water Resources Congress 2019.

<https://doi.org/10.1061/9780784482346.001>

Moore (1981). *The biology of hyphomicrobium and other prosthecate, budding bacteria.*

Annual Review Microbiology, 35:567–594.

<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.35.100181.003031>

Naylor, D., McClure, R. & Jansson, J. (2022). Trends in Microbial Community Composition

and Function by Soil Depth. *Microorganisms*, 10:540.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10030540>

- Nannipieri, P., Ascher-Jenull, L., Ceccherini, M. T., Pietramellara, G., Renella, G. & Schloter, M. (2020). Beyond microbial diversity for predicting soil functions: A mini review. *Pedosphere*, 30(1):5–17. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(19\)60824-6](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(19)60824-6)
- Navarrete-Euan, H., Rodríguez-Escamilla, Z., Pérez-Rueda, E., Escalante-Herrera, K., & Martínez-Núñez, M. A. (2021). Comparing Sediment Microbiomes in Contaminated and Pristine Wetlands along the Coast of Yucatan. *Microorganisms*, 9(4), 877. <https://doi.org/10.3390/microorganisms904087>
- Nwankwoala, H. (2012). Case Studies on Coastal Wetlands and Water Resources in Nigeria. *European Journal of Sustainable Development*, 1(2), 113. <https://doi.org/10.14207/ejsd.2012.v1n2p113>
- Official Site of Monroe County. (2019). Wetlands for Citizens & Land Use Decision Markers. *Monroe County Health Department*. <https://www.monroecounty.gov/files/health/EnvQual/eh-WMWetlandsforCitizens.pdf>
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology*, 43(spc1), 93-100.
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 34:415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Onursal, B. & Gautam, S. P. (1997). Vehicular Air Pollution. Experiences from Seven Latin American Urban Centers. *World Bank Technical Paper*, 373.
- Organización de las Naciones Unidas (2015). Objetivos de Desarrollo Sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

- Otu, Okpokwasili & Ogugbue (2016). IMPACT OF CRUDE OIL POLLUTION ON THE DENSITIES OF NITRIFYING AND DENITRIFYING BACTERIA IN THE RHIZOSPHERE OF TROPICAL LEGUMES GROWN ON WETLAND SOIL. *International Journal of Phytoremediation*, 18(2), 127-135. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1077716>
- Otzen, T. y Manterola, C. (2017). Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio. *International Journal of Morphology*, 35(1):227-232.
- Oyuela, M. M. (2019). Análisis de la microbiota de la vid de distintas regiones vitivinícolas y sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de la Plata.
- Palomares-Rius, J. Archidona-Yuste, A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Prieto, P. & Castillo, P. (2017). Molecular diversity of bacterial endosymbionts associated with dagger nematodes of the genus *Xiphinema* (Nematoda: Longidoridae) reveals a high degree of phylogenetic congruence with their host. *Molecular Ecology*, 26(21), 5837-5855. <https://doi.org/0.1111/mec.13904>
- Palomares-Rius, Gutiérrez-Gutiérrez, Mota, Bert, Claeys, Yushin, Suzina, Ariskina, Evtushenko, Subbotin, Castillo (2021). 'Candidatus *Xiphinematocola pachtaiicus*' gen. nov., sp. nov., an endosymbiotic bacterium associated with nematode species of the genus *Xiphinema* (Nematoda, Longidoridae). *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 71(7):004888. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004888>
- Paradis E & Schliep K. (2018). Ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3): 526–8.

- Pawłowski, J., Bonin, A., Boyer, F., Cordier, T., & Taberlet, P. (2021). Environmental DNA for biomonitoring. *Molecular Ecology*, 30, 2931–2936. <https://doi.org/10.1111/mec.16023>
- Pazinato, Mendes, Vazoller & Tsai (2010). Molecular Characterization of the Archaeal Community in an Amazonian Wetland Soil and Culture-Dependent Isolation of Methanogenic Archaea. *Diversity*. 2(7):1026-1047. <https://doi.org/10.3390/d2071026>
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., Buckler, E. S. & Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6548–6553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302837110>
- Philippot, Raaijmakers, Lemanceau & Van der Putten (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799.
- Polk, M. H., Young, K.R., Cano, A. & León, B. (2019). Vegetation of Andean wetlands (bofedales) in Huascarán National Park, Peru. *International Mire Conservation Group and International Peatland Society*, 24(01): 1–26. <https://doi.org/10.19189/MaP.2018.SNPG.387>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W. G., Peplies, J. & Glöckner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35:7188-7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41: D590–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

- Ramana, Raj, Tushar, Sasikala & Ramana (2013). Rhodomicrobium udaipurense sp. nov., a psychrotolerant, phototrophic alphaproteobacterium isolated from a freshwater stream. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 7): 2684–2689. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.046409-0>
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P., Shinoda, S. (2014). Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in Public Health*, 2:1–9. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00103>
- Ramírez, H. D. (2011). Flora vascular y vegetación de los humedales de Conococha, Ancash, Perú, Tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. http://aplicaciones.cientifica.edu.pe/repositorio/catalogo/_data/62.pdf
- Reddy, K. R., DeLaune, R. & Craft C. B. (2010). Nutrients in wetlands: Implications to water quality under changing climatic conditions. *Final Report submitted to U. S. Environmental Protection Agency*. EPA Contract No. EP-C-09-001
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 525–552. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.0729>
- Riva, V., Mapelli, F., Syranidou, E., Crotti, E., Choukrallah, R., Kalogerakis, N., & Borin, S. (2019). Root Bacteria Recruited by Phragmites australis in Constructed Wetlands Have the Potential to Enhance Azo-Dye Phytodepuration. *Microorganisms*, 7(10), 384. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100384>
- Robeson, M. S., O' Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T. & Bokulich, N. A. (2021). RESCRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLoS Computational Biology*, 17(11): e1009581. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009581>

- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC.
<http://www.rstudio.com/>
- Salazar-Torres, G. & Huszar, V. L. (2012). Microalgae community of the Huaytire wetland, an Andean high-altitude wetland in Peru. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 24(3):285-292.
<https://doi.org/10.1590/S2179-975X2012005000046>
- Salvador, F., Moneris, J. & Rochefort, L. (2014). Peatlands of the Peruvian Puna ecoregion: types, characteristics and disturbance. *Mires and Peat*, 15(3), 1–17. <http://www.mires-andpeat.net/pages/volumes/map15/map1503.php>
- Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhacova, K., Forstova, J., & Kopecky, J. (2008). Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and environmental microbiology*, 74(9), 2902–2907.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02161-07>
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N. & Bagyaraj, D. J. (2020). Bacillus species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, 128(6):1583-1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity. (2009). “Invasive Alien Species” Living in Harmony with Nature, *United Nations Decade on Biodiversity 2010-2020*.
- Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (2016). Plan maestro de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca 2016 - 2020. Arequipa, Perú.
- Schöler, A., Jacquiod, S., Vestergaard, G., Schulz, S., & Schloter, M. (2017). Analysis of soil microbial communities based on amplicon sequencing of marker genes. *Biology and Fertility of Soils*, 53(5), 485–489. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1205-1>

- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J. & Weber, C.F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environmental Microbiology*, Dec;75(23):7537-41. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Simon, A (2020). FASTQC. Disponible en <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. (Revisado el 20 de setiembre del 2022)
- Shahid, Singh, Khan, Singh, Kumar R, Singh, Kumar A & Singh (2023). Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Frontiers Microbiology*, 14:1132770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132770>
- Sherman, Day, Wickliffe, Hawes & Kemp (2003). Soil processes in wetlands. *Wetlands Ecology and Management*, 11(1-2), 35-47. <https://doi.org/10.1023/A:1022840122042>
- SPDA Actualidad Ambiental. (2018). Áncash: Suspenden exploración minera por poner en riesgo suelo y vegetación. <https://www.actualidadambiental.pe/ancash-suspenden-exploracion-minera-por-poner-en-riesgo-suelo-y-vegetacion/>
- Stahl, D. A., Lane, D. J, Olsen, G. J., Pace, N. R. (1984). Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science*, 224: 409–411. <https://doi.org/10.1126/science.224.4647.409>
- Svetashev (2020). The role of Roseiarcus in rhizosphere soils. *Eurasian Soil Science*, 53(6), 731-740. <https://doi.org/10.1134/S106422932006003X>

- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L. & Coissac, E. (2018). Environmental DNA: for biodiversity research and monitoring. *Oxford: Oxford University Press*.
<https://doi.org/10.1093/OSO/9780198767220.001.000>
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C. & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8): 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05470.x>
- Tanasea, A. M., Mereutab, I., Chiciudeanb, J., Ionescub, R., Milea, L., Cornea, C. P., Vassu, T., Stoica, I. (2015). Comparison of Total DNA Extraction Methods for Microbial Community from Polluted Soil. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6:616 – 622. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.102>
- Teng, Chen, Zhang, Yao, Song & Li (2018). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soils of the Yeyahu Wetland in Beijing, China. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2955-5>
- Trettin, et al. (2020). Wetland and Hydric Soils. In: Pouyat, R., Page-Dumroese, D., Patel-Weynand, T., Geiser, L. (eds) *Forest and Rangeland Soils of the United States Under Changing Conditions*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45216-2_6
- Venturini, A. M., Nakamura, F. M., Gontijo, J. B., da França, A. G., Yoshiura, C. A., Mandro, J. A., & Tsai, S. M. (2020). Robust DNA protocols for tropical soils. *Heliyon*, 6(5), e03830. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03830>
- Wang, Lv, Yi, Zheng, Gou, Nie, Hu, Nobu, Narihiro & Tang (2019). Using DNA-based stable isotope probing to reveal novel propionate- and acetate-oxidizing bacteria in propionate-fed mesophilic anaerobic chemostats. *Scientific Reports*, 9 (1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53849-0>

- Wang, R., Wang, M., Wang, J., Yao, Li, Lin & Du (2021). Soil Bacterial Characteristics Under Four Habitats with Different Vegetation Communities on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Wetlands*, 41(5). <https://doi.org/10.1007/s13157-021-01455-0>
- Wetlands International. 2015. Wetland solutions for people and nature Strategic Intent 2015 – 2025.
- Wickham, H. (2016). Data Analysis. In: Use R! Cham. *Springer International Publishing*, p. 189–766.
- Willms, Rudolph, Göschel, Bolz, Schneider, Penone, Poehlein, Schöning & Nacke (2020). Globally Abundant “Candidatus Udaeobacter” Benefits from Release of Antibiotics in Soil and Potentially Performs Trace Gas Scavenging. *mSphere*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/msphere.00186-20>
- Wu, L. S., Nie, Y. Y., Yang, Z. R. & Zhang, J. (2016). Responses of soil inhabiting nitrogen-cycling microbial communities to wetland degradation on the Zoige Plateau, China. *Journal of Mountain Science*, 13(12). <https://doi.org/10.1007/s11629-016-4004-5>
- Xie, K., Deng, Y., Zhang, X., Wang, X., Kang, G., Bai, L. & Huang, H. (2018). Biases in Prokaryotic Community Amplicon Sequencing Affected by DNA Extraction Methods in Both Saline and Non-saline Soil. *Frontiers Microbiology*, 9:1796. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01796>
- Xu, D., Xiao, Xu, P., Zhou, He, Zhou & Wu (2017). Performance and microbial communities of completely autotrophic denitrification in a bioelectrochemically-assisted constructed wetland system for nitrate removal. *Bioresource Technology*. 228:39–46. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.065>

- Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J. & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial ecology*, 8: 313 – 323. <https://doi.org/10.1007/BF02010671>
- Yang, Jiang, Zhu, Han & Qin (2019). Soil Bacterial Communities with an Indicative Function Response to Nutrients in Wetlands of Northeastern China that have Undergone Natural Restoration. *Ecological Indicators*. 2019, 101, 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.037>
- Yang, Y., Ding, J., Chi, Y. & Yuan, J. (2020). Characterization of bacterial communities associated with the exotic and heavy metal tolerant wetland plant *Spartina alterniflora*. *Scientific Reports*, 10: 17985. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75041-5>
- Young, K. R. & León, B. L. (2007). Tropical and subtropical landscapes of the Andes. *The Physical Geography of South America*. Oxford University Press, 200–216. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195313413.003.0020>
- Yarwood, S. A. (2018). The role of wetland microorganisms in plant-litter decomposition and soil organic matter formation: a critical review, *FEMS Microbiology Ecology*, 94 (11). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy175>
- Ziegler, G. (2020). Arrasar la tierra: una comunidad resiste el tráfico de humedales. Ojo Público.
- Zhang, Chen & Ruan (2018). Global negative effects of nitrogen deposition on soil microbes. *ISME Journal*. 12(7), 1817–1825. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0096-y>

- Zhang, X., Hu, W., Jin, X., Chen, T. y Niu, Y. (2021). Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo en los suelos de la rizósfera y no rizósfera del humedal del lago Ebinur. *Archives of Microbiology*, 203 (7), 3919–3932. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02363-x>
- Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C. W. & Ding, T. (2017). Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8:580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580>
- Zou, Yuan, Ming, Li, Yang Y., Yang R., Cheng, Liu, Jiang, Luan & Chen (2022). Changes in Alpine Soil Bacterial Communities With Altitude and Slopes at Mount Shergyla, Tibetan Plateau: Diversity, Structure, and Influencing Factors. *Frontiers Microbiology*, 13:839499. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.839499>

IX. ANEXOS

ANEXO A. Muestreo de suelos rizosféricos



Fotos del bofedal de Pumacocha, tomadas por encargados de la ONG Yuran Yaqu, responsables del Proyecto Prociencia N°035-2021

ANEXO B. *Análisis fisicoquímico de los suelos rizosféricos de las zonas muestreadas en el bofedal*

Lab.	Muestras	Zona	C.E. (dS/m)	Arena %	Limo %	Arcilla %	Textura	pH	M.O. %
17268	BI 1,2,3,4,5	ZI-1	0.42	65.44	29.84	4.72	Franco arenoso	3.83	17.93
17269	BI 6,7,8,9,10	ZI-2	0.20	53.44	42.84	3.72	Franco arenoso	4.09	17.80
17270	BI 11,12,13,14,15	ZI-3	0.16	69.44	23.84	6.72	Franco arenoso	4.00	17.34
17271	BNI 1,2,3,4,5	ZNI-1	0.46	95.44	1.84	2.72	Arena	5.91	43.35
17272	BNI 6,7,8,9,10	ZNI-2	0.33	85.44	8.84	5.72	Arena franca	4.01	34.81
17273	BNI 11,12,13,14,15	ZNI-3	0.74	93.44	1.84	4.72	Arena	3.76	42.03
Lab.	Muestras	Zona	Cationes intercambiables						
			CIC total	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na*	K-	Al ³⁺ +H ⁺¹	CaCO ₃ %
17268	BI 1,2,3,4,5	ZI-1	18.94	1.88	0.33	0.09	0.44	16.20	-
17269	BI 6,7,8,9,10	ZI-2	8.96	1.35	0.39	0.19	0.63	6.40	-
17270	BI 11,12,13,14,15	ZI-3	13.91	1.40	0.43	0.34	0.64	11.10	-
17271	BNI 1,2,3,4,5	ZNI-1	7.69	4.10	1.65	0.51	0.53	0.90	-
17272	BNI 6,7,8,9,10	ZNI-2	10.46	3.86	1.03	0.29	0.75	4.52	-
17273	BNI 11,12,13,14,15	ZNI-3	12.58	5.90	0.95	0.20	0.83	4.70	-

ANEXO C. Evidencias experimentales de la extracción de DNA de suelos rizosféricos

Figura C.1

Evidencias del suelo sedimentado posterior al lisado celular bacteriano



Figura C.2

Eliminación de ácidos húmicos con CaCl₂ de suelos rizosféricos



ANEXO D. Cuantificación de DNA extraído de suelos rizosféricos mediante espectrofotometría

Tabla D.1

Cuantificación de DNA extraído mediante espectrofotometría de suelos rizosféricos de las zonas no impactadas por actividad antropogénica

Extraction DNA		Eppendorf BioSpectrometer® basic				
Sample ID	DNA QC Date	vol. Sample ($\mu\ell$)	Conc. (ng/ $\mu\ell$)	A260/A280	A260/A230	DNA QC Date
BNI1	19/04/2022	1	154.5	1.85	1.45	21/05/22
BNI2	20/04/2022	1	448	1.82	1.74	21/05/22
BNI3	20/04/2022	1	179.6	1.8	1.38	21/05/22
BNI4	21/04/2022	1	477.1	1.8	1.74	21/05/22
BNI5	19/04/2022	1	145.9	1.84	1.43	21/05/22
BNI6	22/04/2022	1	208.4	1.75	1.03	21/05/22
BNI7	22/04/2022	1	100.6	1.7	0.91	21/05/22
BNI8	23/04/2022	1	91.6	1.77	1.02	21/05/22
BNI9	23/04/2022	1	509.7	1.79	1.43	21/05/22

BNI10	24/04/2022	1	475.7	1.78	1.32	21/05/22
BNI11	24/04/2022	1	178.2	1.78	1.09	21/05/22
BNI12	20/04/2022	1	162.5	1.73	0.87	22/05/22
BNI13	22/04/2022	1	126.4	1.8	1.13	23/05/22
BNI14	18/04/2022	1	81	1.84	1.17	21/05/22
BNI15	22/04/2022	1	90.8	0.83	1.32	23/05/22

Tabla D.2

Cuantificación de DNA extraído mediante espectrofotometría de suelos rizosféricos de las zonas impactadas por actividad antropogénica

Extraction DNA		Eppendorf BioSpectrometer® basic				
Sample ID	DNA QC Date	vol. Sample ($\mu\ell$)	Conc. (ng/ $\mu\ell$)	A260/A280	A260/A230	DNA QC Date
BI1	22/05/2022	1	443.9	1.73	0.96	23/05/22
BI2	30/04/2022	1	850.9	1.77	1.17	21/05/22
BI3	22/04/2022	1	593.6	1.69	0.86	23/05/22
BI4	30/04/2022	1	972.1	1.78	1.24	21/05/22

BI5	1/05/2022	1	1100.4	1.8	1.29	21/05/22
BI6	1/05/2022	1	204.6	1.77	0.86	21/05/22
BI7	1/05/2022	1	164.5	1.77	0.85	21/05/22
BI8	1/05/2022	1	149.7	1.79	1.06	21/05/22
BI9	2/05/2022	1	244.5	1.73	0.89	21/05/22
BI10	2/05/2022	1	173.5	1.79	0.99	21/05/22
BI11	2/05/2022	1	126.9	1.73	0.79	21/05/22
BI12	20/05/2022	1	526.6	1.69	0.74	22/05/22
BI13	20/05/2022	1	441.8	1.75	0.82	22/05/22
BI14	21/05/2022	1	261	1.75	0.86	22/05/22
BI15	21/05/2022	1	180.8	1.71	0.82	22/05/22

ANEXO E. Cuantificación de DNA extraído de suelos rizosféricos mediante fluorometría

Tabla E.1

Cuantificación de DNA extraído mediante fluorometría de suelos rizosféricos de las zonas no impactadas por actividad antropogénica

Extraction DNA		Fluorómetro Quantus™ - Promega con kit de. Invitrogen (Estándar=200ng/μℓ)			Fluorómetro - servicio externo de secuenciación Illumina Miseq (Macrogen)	
Sample ID	DNA QC Date	vol. Sample (μℓ)	Conc. (ng/μℓ)	DNA QC Date	Conc. (ng/μℓ)	DNA QC Date
BNI1	19/04/2022	1	192	21/05/22	73.548	2/09/22
BNI2	20/04/2022	1	168	21/05/22	124.87	2/09/22
BNI3	20/04/2022	1	174	21/05/22	115.127	2/09/22
BNI4	21/04/2022	1	177	21/05/22	159.9	2/09/22
BNI5	19/04/2022	1	137	21/05/22	79.626	2/09/22
BNI6	22/04/2022	1	144	21/05/22	101.917	2/09/22
BNI7	22/04/2022	1	116	21/05/22	66.625	2/09/22
BNI8	23/04/2022	1	202	21/05/22	58.786	2/09/22

BNI9	23/04/2022	1	152	21/05/22	108.063	2/09/22
BNI10	24/04/2022	1	195	21/05/22	96.293	2/09/22
BNI11	24/04/2022	1	150	21/05/22	91.889	2/09/22
BNI12	20/04/2022	1	78	22/05/22	33.299	2/09/22
BNI13	22/04/2022	1	202	23/05/22	55.061	2/09/22
BNI14	18/04/2022	1	174	21/05/22	47.638	2/09/22
BNI15	22/04/2022	1	170	23/05/22	60.178	2/09/22

Tabla E.2

Cuantificación de DNA extraído mediante fluorometría de suelos rizosféricos de las zonas impactadas por actividad antropogénica

Extraction DNA		Fluorómetro Quantus™ - Promega con kit de. Invitrogen (Estándar=200ng/μℓ)			Fluorómetro - servicio externo de secuenciación Illumina Miseq (Macrogen)	
Sample ID	DNA QC Date	vol. Sample (μℓ)	Conc. (ng/μℓ)	DNA QC Date	Conc. (ng/μℓ)	DNA QC Date
BI1	22/05/2022	1	165	23/05/22	75.452	2/09/22
BI2	30/04/2022	1	160	21/05/22	180.4	2/09/22

BI3	22/04/2022	1	>200	23/05/22	127.336	2/09/22
BI4	30/04/2022	1	>200	21/05/22	215.73	2/09/22
BI5	1/05/2022	1	>200	21/05/22	181.265	2/09/22
BI6	1/05/2022	1	173	21/05/22	66.915	2/09/22
BI7	1/05/2022	1	192	21/05/22	89.026	2/09/22
BI8	1/05/2022	1	197	21/05/22	59.083	2/09/22
BI9	2/05/2022	1	114	21/05/22	45.899	2/09/22
BI10	2/05/2022	1	156	21/05/22	50.905	2/09/22
BI11	2/05/2022	1	127	21/05/22	36.971	2/09/22
BI12	20/05/2022	1	145	22/05/22	97.361	2/09/22
BI13	20/05/2022	1	161	22/05/22	118.175	2/09/22
BI14	21/05/2022	1	155	22/05/22	66.221	2/09/22
BI15	21/05/2022	1	145	22/05/22	75.493	2/09/22

ANEXO F. *Control de calidad de la data cruda post-secuenciamiento Illumina Miseq (R Studio)*

Figura F.1

Control de calidad de la data cruda de las secuencias Forward obtenidas post-secuenciamiento Illumina Miseq del amplicon 16S (R Studio)

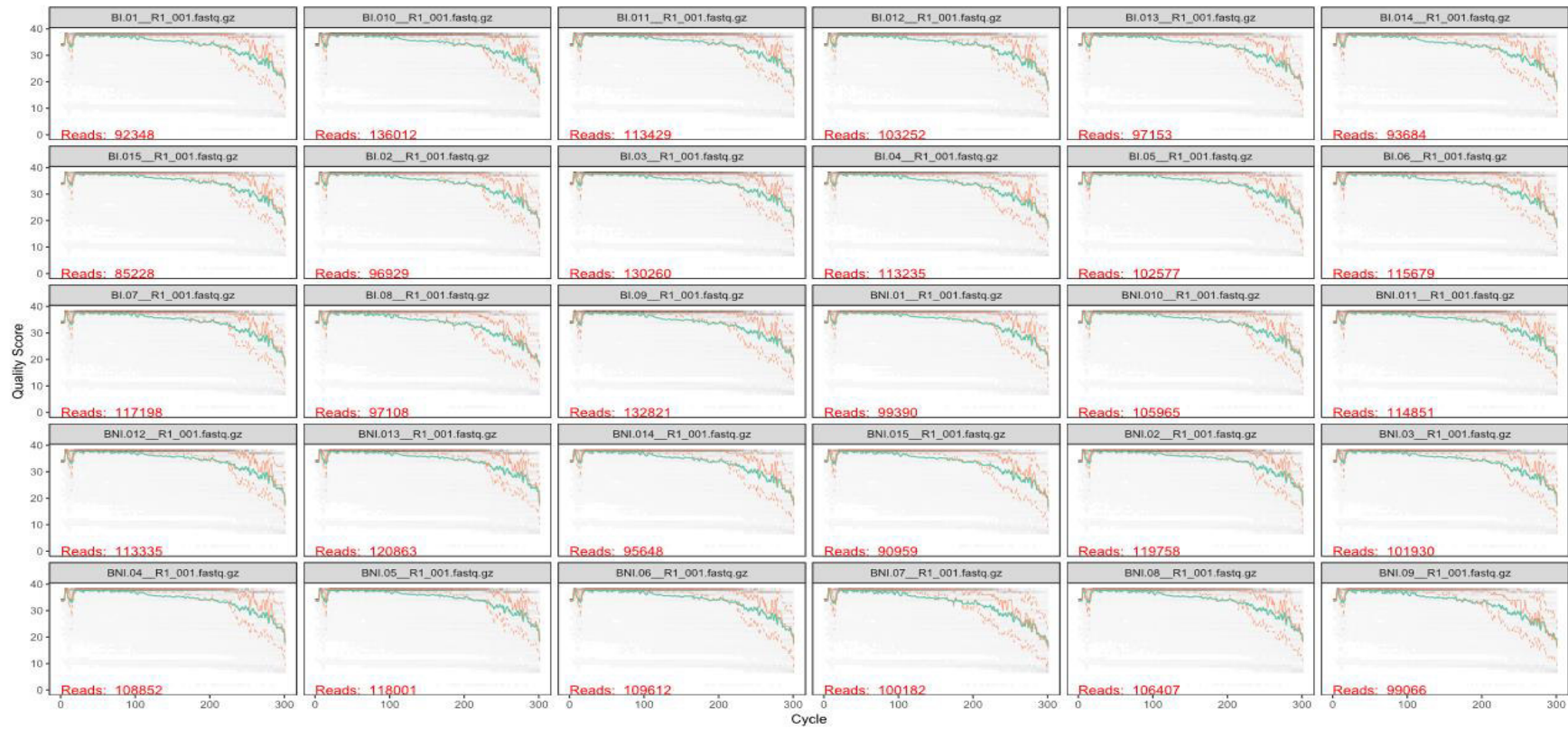
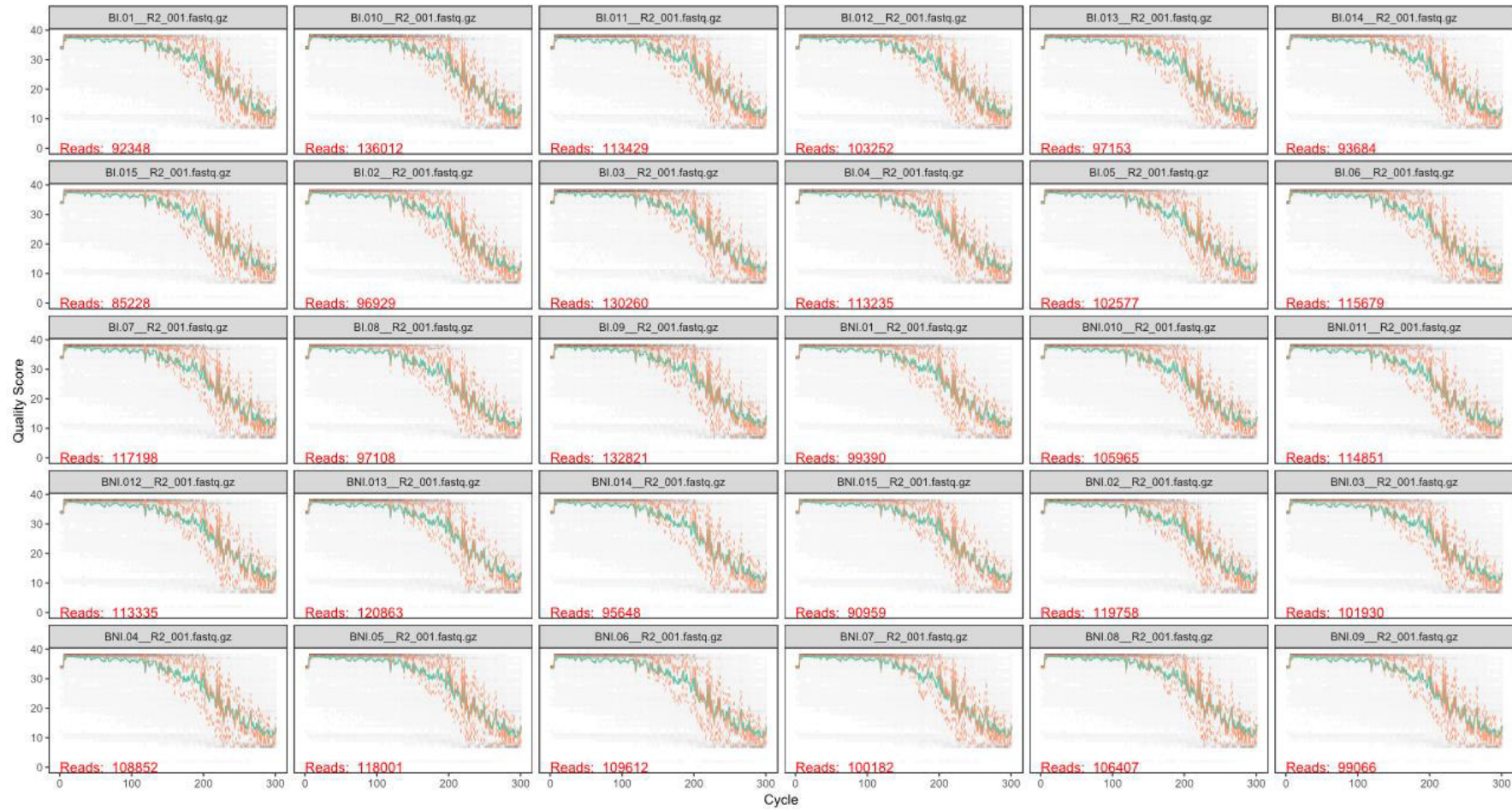
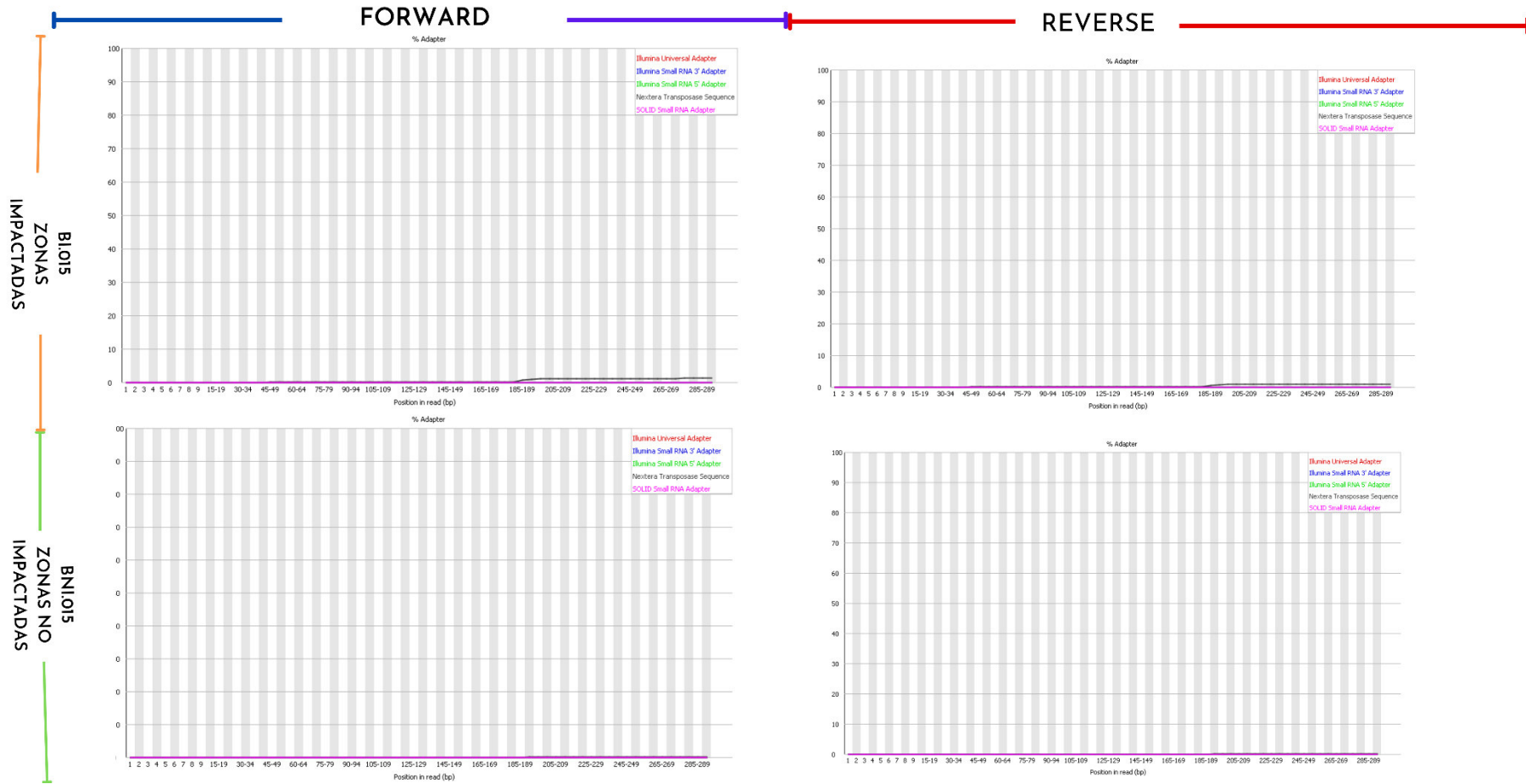


Figura F.2

Control de calidad de la data cruda de las secuencias Reverse obtenidas post-secuenciamiento Illumina Miseq del amplicon 16S (R Studio)



ANEXO G. Ausencia de adaptadores en los archivos fastq de la data cruda obtenida post secuenciamiento (FASTQC)



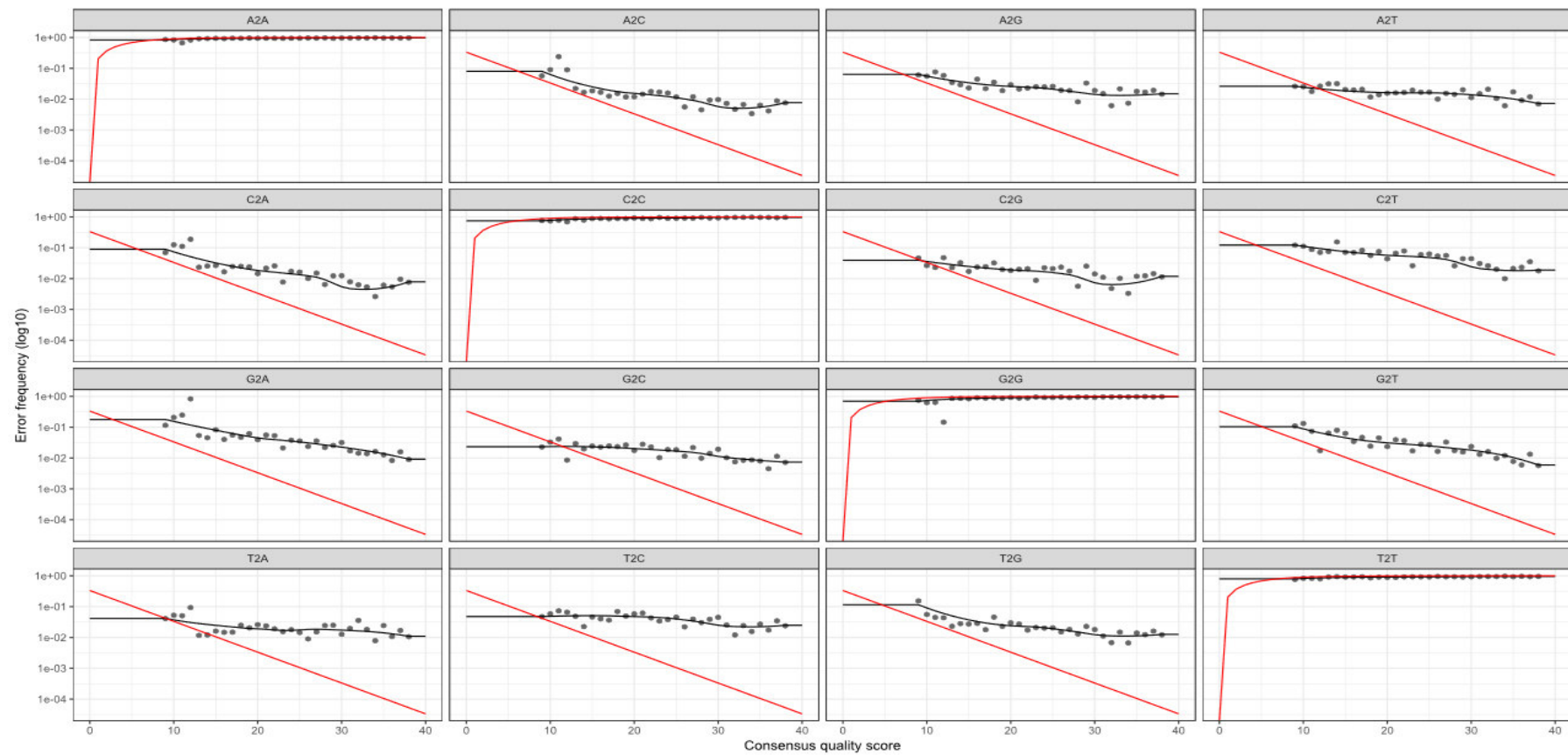
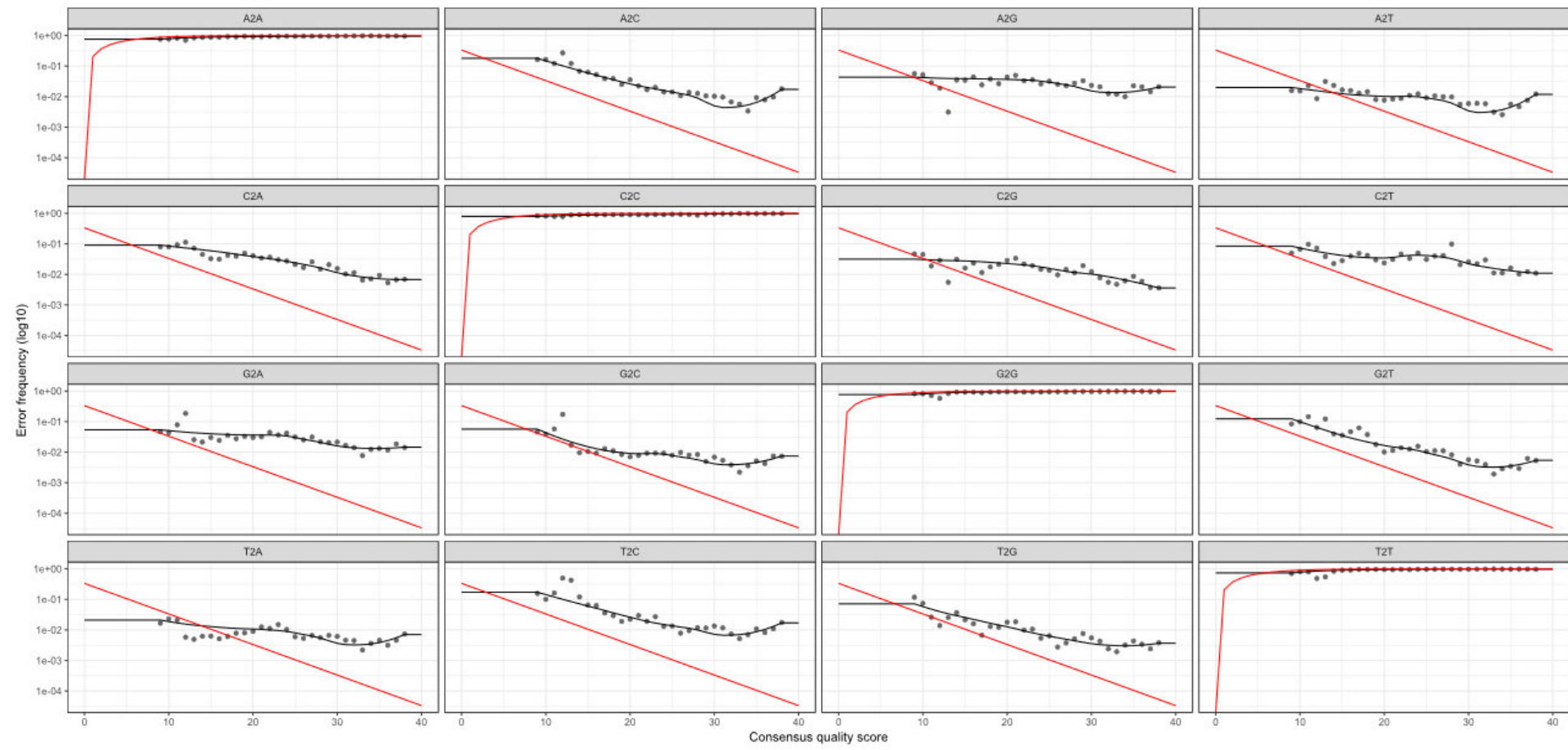
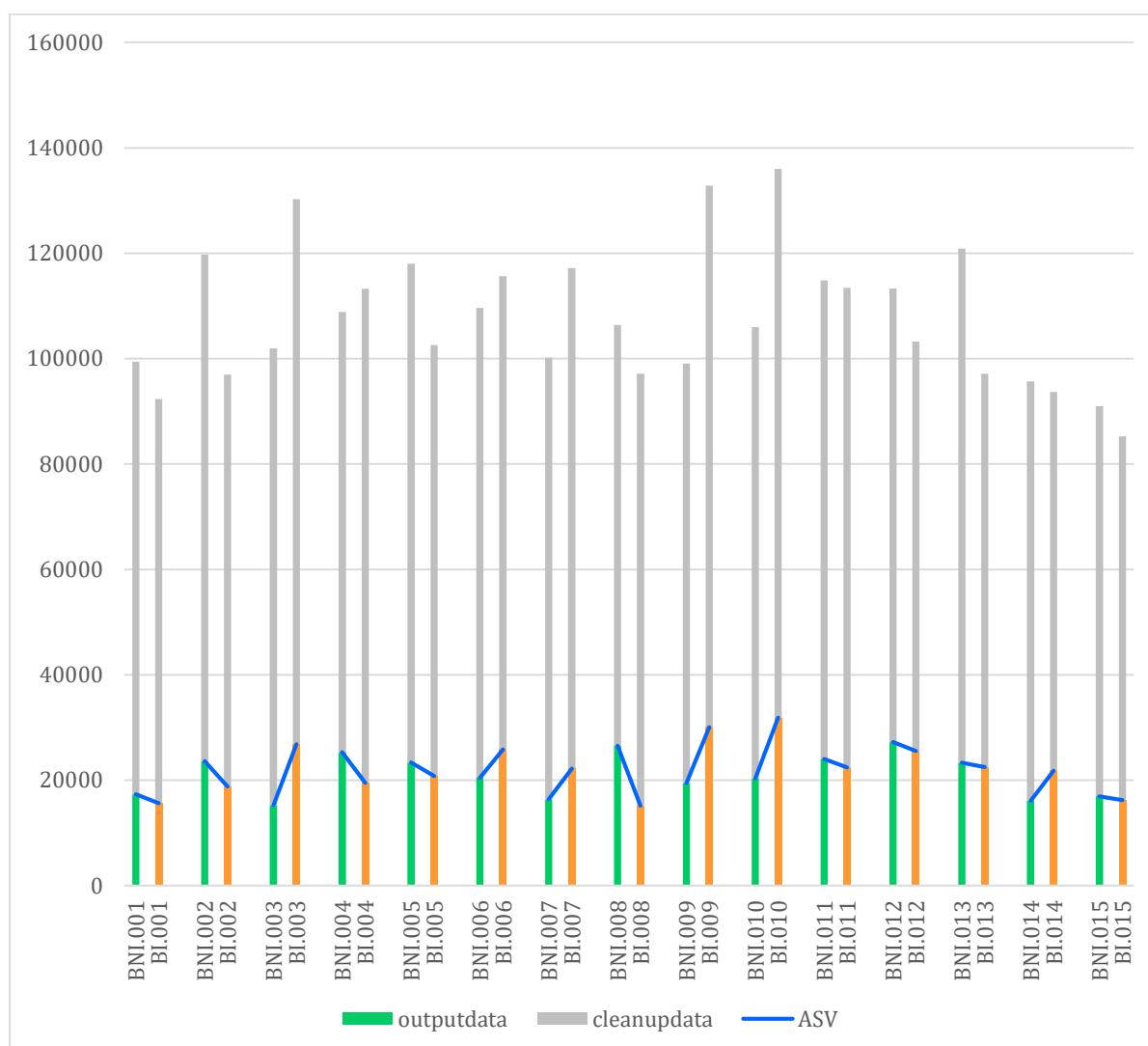
ANEXO H. *Construcción del modelo de error de las secuencias filtradas para designar ASV (R Studio)***Figura H.1***Construcción del modelo de error de las secuencias Forward limpias para inferir ASV previo pareamiento de las secuencias (R Studio)*

Figura H.2

Construcción del modelo de error de las secuencias Reverse para inferir ASV previo pareamiento de las secuencias (R Studio)

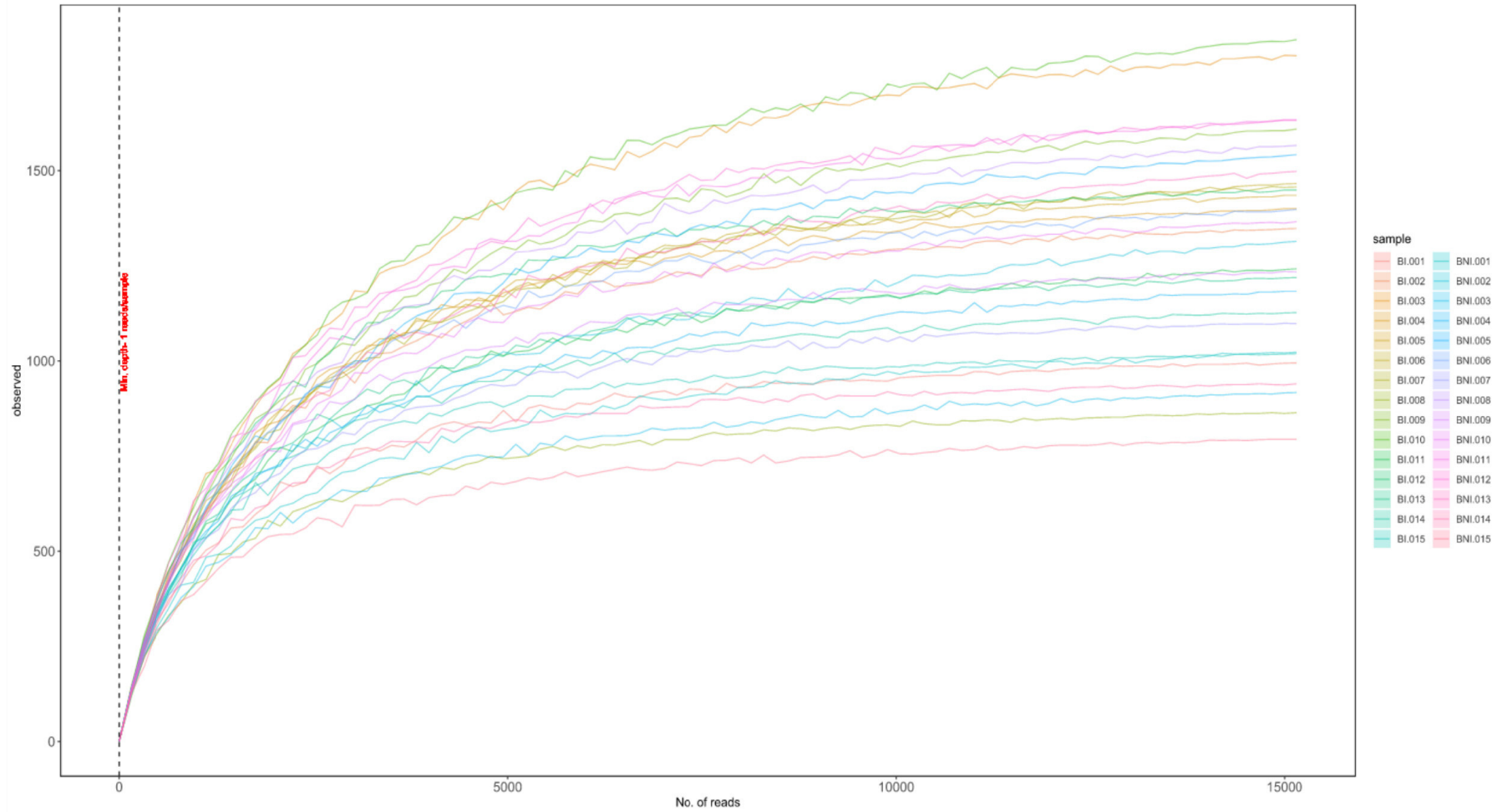


ANEXO I. Cantidad de secuencias de DNA crudas y secuencias filtradas post-secuenciamiento (R Studio)



Nota: BNI: Bofedal no impactado, BI: Bofedal impactado. Se observó que por Área de muestreo: Área 1 (BNI 001 – BI 001, BNI 002 – BI 002, BNI 003 – BI 003, BNI 004 – BI 004, BNI 005 – BI 005), Área 2 (BNI 006 – BI 006, BNI 007 – BI 007, BNI 008 – BI 008, BNI 009 – BI 009, BNI 010 – BI 010) y Área 3 (BNI 011 – BI 011, BNI 012 – BI 012, BNI 013 – BI 013, BNI 014 – BI 014, BNI 015 – BI 015) que en promedio se inició con una data cruda de 107 724 “reads” de 300 pb cada una, y posterior a la limpieza, filtrado y pareado de secuencias Forward y Reverse se obtuvo 21 700 reads de los cuales se halló 22733 ASV’s.

ANEXO J. Rarefacción de ASV's post-limpieza y pareamiento de las secuencias Forward y Reverse (R Studio) por muestra



ANEXO K. 24 géneros taxonómicos a partir de losASV's más representativos del DNA de suelos de las zonas con impacto antropogénico

Zonas	ZI1			ZI 2						ZI3					
Replicas	BI.00	BI.00	BI.00	BI.00	BI.00	BI.00	BI.00	BI.00	BI.00	BI.0	BI.0	BI.0	BI.0	BI.0	BI.0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
HSB OF53-F07	2113	3087	3174	2764	2693	3627	3363	1749	577	889	1768	6050	2191	1813	3055
Acidothermus	789	1724	1502	1835	2656	2267	1844	1762	1336	1302	710	1030	2007	1728	2434
Bacillus	591	611	100	1428	790	750	553	523	118	232	190	135	315	173	164
Candidatus Solibacter	432	355	967	591	160	473	568	547	1574	1879	1659	719	1050	949	352
Rhodomicrobium	155	158	142	316	306	492	442	305	115	242	153	133	323	103	119
Roseiarcus	454	281	398	470	436	478	552	542	726	686	361	482	426	373	479
Candidatus Xiphinematobacter	240	347	414	236	295	624	427	374	1290	1069	199	98	661	386	229
Aquisphaera	104	55	430	344	272	331	484	790	796	569	479	88	344	284	254

Candidatus Udaeobacter	322	1124	760	488	403	312	269	108	265	549	241	168	630	76	15
Candidatus Koribacter	657	0	257	95	0	160	138	642	1279	1062	779	587	358	450	474
Pedomicrobium	42	72	74	0	76	47	69	0	60	82	112	133	33	0	0
JG30a-KF-32	712	716	891	892	840	568	562	125	134	119	75	115	372	244	230
Bryobacter	147	164	361	85	143	554	349	92	657	1270	491	678	325	776	287
Mycobacterium	142	106	483	189	477	485	152	98	74	309	47	402	58	283	0
Bradyrhizobium	177	362	313	412	309	80	104	82	12	225	22	18	35	17	84
mle1-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conexibacter	81	181	255	0	275	878	391	0	50	240	35	115	204	159	145
Haliangium	12	0	19	40	0	33	3	0	129	106	395	0	0	0	8
Reyranela	249	96	276	192	74	0	146	141	178	253	220	183	2	130	247
Clostridium sensu stricto 9	103	67	123	64	63	0	109	0	0	44	3	532	69	0	18
1921-2	4	41	132	0	103	521	421	94	290	139	93	452	402	297	191

Pajaroellobacter	31	25	228	0	0	236	228	24	513	698	171	250	99	212	0
Nitrobacter	117	93	188	123	138	141	121	59	108	172	199	197	190	184	138
ADurb.Bin063-1	84	139	242	98	68	93	72	31	203	280	392	185	160	105	26

ANEXO L. 24 géneros taxonómicos a partir de losASV's más representativos del DNA de suelos de las zonas sin impacto antropogénico

Zonas	ZNI1					ZNI2					ZNI3				
	BNI.001	BNI.002	BNI.003	BNI.004	BNI.005	BNI.006	BNI.007	BNI.008	BNI.009	BNI.010	BNI.011	BNI.012	BNI.013	BNI.014	BNI.015
Replicas															
HSB OF53-F07	0	0	0	8	84	2864	3089	732	3379	2343	2637	2361	0	1432	43
Acidothermus	257	2	163	307	929	2893	2767	2569	2775	1336	1734	934	179	1207	109
Bacillus	521	1093	758	221	345	437	437	3850	946	2785	2746	2009	1563	228	279
Candidatus Solibacter	367	390	324	545	493	418	165	557	154	493	424	165	6	0	90
Rhodomicrobium	289	211	398	418	692	1150	162	449	196	489	529	670	668	697	569
Roseiarcus	0	0	0	0	169	563	599	939	406	394	401	564	9	116	68

Candidatus Xiphinematobacter	265	215	342	222	211	135	67	204	205	219	252	325	382	168	358
Aquisphaera	99	41	73	189	508	510	136	670	385	486	327	296	211	401	125
Candidatus Udaeobacter	263	213	265	426	542	0	0	0	0	0	0	85	483	75	292
Candidatus Koribacter	0	0	0	0	78	255	201	504	119	359	292	217	0	49	0
Pedomicrobium	384	180	534	513	513	220	91	196	385	282	520	1227	515	889	200
JG30a-KF-32	0	0	0	0	0	261	0	99	151	324	222	10	0	77	0
Bryobacter	31	122	116	73	207	78	0	265	90	137	0	70	38	0	69
Mycobacterium	252	137	60	253	108	298	67	309	271	162	230	127	365	93	112
Bradyrhizobium	266	224	152	309	29	14	65	32	46	6	19	369	257	96	180
mle1-7	382	631	477	500	454	0	0	0	0	0	0	305	179	83	505
Conexibacter	56	29	0	398	114	122	95	276	123	112	87	78	171	110	0
Haliangium	293	416	264	558	374	0	0	0	0	56	44	54	67	79	123
Reyranella	0	87	108	114	73	123	20	142	0	96	73	173	35	43	2

Clostridium sensu stricto 9	6	57	0	59	49	105	121	67	132	106	118	704	348	159	212
1921-2	0	0	0	0	0	0	78	156	72	58	42	0	0	0	0
Pajaroellobacter	0	0	2	78	59	107	139	320	98	0	0	59	0	0	44
Nitrobacter	10	12	8	75	74	121	111	79	224	103	145	193	11	40	0
ADurb.Bin063-1	81	129	0	102	169	41	40	118	0	0	90	76	0	52	0