Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Diversidad de las comunidades microbianas de los suelos pampeanos. Enfoques ecológicos y metagenómicos

Carbonetto, María Belén

2014

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Carbonetto, María Belén. (2014). Diversidad de las comunidades microbianas de los suelos pampeanos. Enfoques ecológicos y metagenómicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Carbonetto, María Belén. "Diversidad de las comunidades microbianas de los suelos pampeanos. Enfoques ecológicos y metagenómicos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Diversidad de las comunidades microbianas de los suelos pampeanos.

Enfoques ecológicos y metagenómicos.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. María Belén Carbonetto

Director de Tesis: Dr. Martín P. Vázquez

Consejero de Estudios: Dr. Alberto Kornblihtt

Lugar de trabajo: Plataforma de Genómica y Bioinformática, Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR)- Predio CCT Rosario-CONICET

Buenos Aires, 2014.

Diversidad de las comunidades microbianas de los suelos pampeanos.

Enfoques ecológicos y metagenómicos.

El suelo es uno de los ambientes más biodiversos y heterogéneos del planeta y los ciclos biogeoquímicos que en él suceden son de suma importancia para la vida. Estos procesos son llevados a cabo por microorganismos, mayoritariamente del grupo Bacteria y Arquea. A su vez, el suelo es un recurso esencial para los seres humanos ya que es su fuente principal de alimentos, pero como cualquier recurso natural, es finito. Por lo tanto el estudio del impacto de las modificaciones agrícolas en las características físicas, químicas y biológicas del suelo y por ende en los procesos del ecosistema, es imprescindible.

El 50% de la superficie de Región Pampeana está dedicada a la agricultura. El impacto de las prácticas agrícolas sobre las características físicas y químicas del suelo, ha sido ampliamente estudiado en la región. Sin embargo, y más allá del gran esfuerzo realizado, todavía hay una deuda por comprender las consecuencias del uso agrícola sobre la biodiversidad y procesos biológicos. El trabajo aquí presentado pretende saldar parte de esta deuda estudiando el impacto que ejerce la agricultura sobre las comunidades bacterianas de suelos de la Región Pampeana. Se utilizaron técnicas de metagenómica y un enfoque ecológico.

El primer capítulo se centró en estudiar el impacto de más de 100 años de agricultura sobre la estructura de las comunidades microbianas y sus perfiles metabólicos (metagenómicos). Se encontraron diferencias significativas entre comunidades de suelos con y sin historia de manejo agrícola.

El segundo capítulo se dedicó a la comparación de dos sistemas de labranza. Se estudió la estructura de diversidad y el perfil metagenómico de comunidades de suelos bajo labranza convencional y bajo siembra directa. Vimos que las comunidades difirieron en su composición taxonómica y metabólica según el tipo de labranza a la cual fueran sometidas.

El objetivo del tercer capítulo fue determinar el patrón regional de distribución bacteriano. Este análisis se realizó dentro del marco de la Teoría de Metacomunidades y utilizando datos de suelos con y sin historia de manejo de una transecta Este-Oeste que abarcó el gradiente edáfico y climático completo de la Región Pampena. Los

resultados mostraron que los efectos de la dispersión fueron más importantes que los efectos contemporáneos a nivel regional, enmascarando así los impactos locales generados por el uso agrícola.

Palabras clave: ecología microbiana, microbiología de suelos, Región Pampeana, metagenómica, agricultura.

Diversity of soil microbial communities of The Pampas.

Ecological and metagenomic approaches.

Soil is one of the most biodiverse and heterogeneous environments of Earth. Soil bio-chemical processes are essential for life and are carried out by microorganisms, mainly Bacteria and Archaea. Moreover soil is very important for humans, since it is the main source of food; but as any other natural resource it is not limitless. Though studying the impact of agriculture on soil physical, chemical and biological characteristics, and hence on ecosystem processes is imperative.

The 50% of Pampas surface is devoted to agriculture. The impact of agricultural practices on soil physical and chemical properties has been extensively studied in the region. However, beyond the great effort made, there is a debt yet to understand the consequences of agriculture on biodiversity and biological processes. The work presented here aims to repay part of this debt by studying the impact of agriculture on soil bacterial communities of the Pampas. We used an ecological approach and 50% of the surface of Pampas is devoted to agriculture. The impact of agricultural practices on soil physical and chemical characteristics has been extensively studied in the region. However, beyond the great effort made, there is a debt yet to understand the consequences of agricultural biodiversity and biological processes. The work presented here aims to repay this debt of studying the impact that agriculture on soil bacterial communities of the Pampas. We used an ecological approach and metagenomics.

The first chapter was focused on the study of the impact of over 100 years of farming on the structure of microbial communities and their metabolic (metagenomic) profiles. Significant differences between communities of soils with and without a history of agricultural management were found.

The second chapter is devoted to the comparison of two tillage systems. We studied the structure and metagenomic profiles of soil communities under conventional tillage and no-tillage. We found that communities differ in their taxonomical composition and metabolisms.

The aim of the third chapter was to determine the regional pattern of bacterial distribution. This analysis was performed within the framework of the theory of metacommunities. We sampled soils with and without soil management history, in an East-West transect that spanned the entire climatic and edaphic gradient of the

Pampas. The results showed that dispersion was more important than environmental contemporaneous effects at the regional level, thus masking local impacts generated by agricultural use.

Key words: microbial ecology, soil microbiology, Argentine Pampas, metagenomics, agriculture.

Agradecimientos

(Presiento que esto va a ser como ir sacándole capas a una cebolla...)

Primero que a nadie quiero agradecer a Martin Vázquez por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto. Desde el día que nos contó lo que era la metagenómica highthroughput allá por el año 2007, en una clase de Agrobiotecnología, quede impactada, quería hacer eso: quería usar esa "maquina casi mágica que te dejaba ver que estaba pasando donde antes no se podía mirar" , al menos no con ese grado de aumento. Fuimos varios los tentados. Al recibirme, sin embargo, tome otro rumbo, pero la vida me volvió a encontrar con este proyecto que además incluía al INDEAR y a Rosario. Todo un desafío, pero un desafío super estimulante. No pude decir que no y me mudé a Rosario. Gracias Martín entonces por dejarme generar esta bisagra en mi vida. Luego de casi 5 años de este recorrido puedo decir que estoy muy satisfecha y contenta con lo que logramos. Una vez más, gracias!

Quiero agradecer también a todos los miembros de *Soilgene* por sus aportes y discusiones, haber formado parte de un grupo interdisciplinario fue muy importante en mi formación. Importante y desafiante en algún punto. No es fácil hablar en el idioma de los agrónomos, por ejemplo, o ponernos de acuerdo entre unas 20 personas sobre si "las muestras se toman del surco o del entre surco, si los primeros 20 cm o los primeros 10 cm ....". Además, de la experiencia rescato que el trabajo interdisciplinario es esencial para el desarrollo científico, hay que abrirse y debatir, discutir y escuchar otros puntos de vista más lejanos; este intercambio es de las cosas más ricas que tiene la ciencia y hay que aprovecharlo.

Quiero darle las gracias a todos los **amigos** de Rosario (rosarinos o no), que linda gente conocí! Gracias sobre todo a Meli, Lucas, Vale y Carlos, que lindo es hacerse de nuevos amigos en el camino.

Gracias "genómicos" por todo. Fueron como mi segunda familia (jeje). Creo que la pasmos muy bien no? Y como aprendimos! entramos al la Plataforma de Genómica siendo simples Licenciados (o casi licenciados) y ahora somos Expertos, porque lo somos, hemos crecido. Gracias por las cenas, asados y salidas. Qué lindo que es trabajar con gente así. A todos, además: chapeau!! Gracias Sole, Bianquis, Santi, Moni, Estefi, Laris, Maru y Nico. Qué equipo!!!! Los quiero!

Gracias a Santi por toda tu ayuda con cada "detallecito" que escapaba a mis conocimientos técnicos de informática y por responder siempre (y casi siempre sin queja alguna) al llamado de "Santiiiiii, como hago esto? y esto otro?". Gracias Master!!

Gracias Estefi. Encontré en una compañera una gran amiga. Gracias por insistirme con que R era LA solución. Siempre un placer! Mil gracias!

A Maru..... con Maru no me alcanza la palabra "gracias". Ya te quiero como a una hermana, nos hicimos tan amigas estos últimos años...en fin, te quiero mucho nena!! Gracias por estar siempre!! te voy a extrañar mucho...

Nico, a vos más que a nadie GRACIAS. Genio total!!! Se hizo duro por momentos el camino de la tesis, eh? pero también fue muy divertido! El combo Rascovan-Soilgene-Indear-Rosario fue explosivo. Nos conocemos hace años, sabes que te adoro. Gracias por ser EL compañero de equipo estos 5 años. Hemos tenido diferencias y las vamos a seguir teniendo, y las vamos a seguir discutiendo, pero también tenemos encuentros y creo que sumar fuerzas siempre es bueno, muy bueno. Como te voy a extrañar chabón!!! Nos vemos en la France!!! con asado incluido, obvio! (sos mejor asador de lo que pensás...) Gracias por todo!

Gracias le quiero decir también a Caro Grandellis. Carito, te conozco hace poco, pero ya sos una gran amiga, estos últimos meses de la tesis además fuiste mi "editora estrella". Gracias genia!! ya vamos a brindar!

Gracias a Roxi. Otra genia! otra compañera de ruta...nos hemos reído eh! Increíble que esto termine no?

Gracias a mis amigas de la vida: Jennas y Miru! Siempre presentes, desde lejos o desde cerca, pero siempre tirando buenas ondas y haciendo el aguante. Que son 17 años de amistad, sino amor incondicional?! las quiero pibas!!!

Gracias a mi amiga del alma Andy, aunque lejos siempre estas. Cuando nos re-encontramos es como si no pasara el tiempo, eso es muy importante! Te quiero amiga!!! Gracias por todo desde siempre!!

A mis amigas de Exactas también mil gracias! Gi, Ulli, Nati, las adoro! Por las charlas, por los brindis, por la risa..."La vida es lindaaaaaa", no Nati? te quiero nena!

Muchas gracias a Noe!! Que reencuentro amiga! gracias por todo, por estar siempre, por escuchar, por las salidas, por las charlas, por reírnos tanto! Sos muy grosa! te quiero mucho! Gracias por estar.

A Silvina, miles de gracias. Casi sin saberlo, fuiste mi Gurú en muchas situaciones. Gracias por el aguante. Qué lindo tener una amiga con tu energía, sos casi terapéutica Sil. Te quiero che! Gracias por todo!

Al grupo "del lago" muchas gracias! Gente tan copada como ellos creo que no me voy a volver a cruzar. Son años de anécdotas y diversión! Estos ultimo 5 además fueron de lujo, sobre todo el viaje al lago! Gracias chicos! Son muy grosos!

A los chicos de "BET": gracias desquiciados, hicieron mucho mas fácil esta última etapa. Gracias por los ánimos, por los tips y trucos y sobre todo por la risa! que grandes! que no se corte.....

A mis primos hermosos! Carito y Tato, gracias por estar, por hacerme reír. Me hacen feliz. Los quiero!

A Seba, miles de millones de gracias! Además de mi hermanito sos mi gran amigo. Ni te tengo que explicar porque te agradezco, ya sabes, por todo: por escuchar, por estar, por las risas, por las broncas, por los silencios....por todo. Sos muy groso pendex! Te quiero mucho!

A mis viejos....César y Élida. Los amo, gracias por la vida. Gracias por el amor. Gracias también por las broncas y los choques. Somos quien somos, con Seby, por ustedes. La verdad, que se pasaron, y se siguen pasando. No tengo más que agradecimiento infinito por todo lo que nos dieron. Parece que no es tan fácil ser padres, pero creo que lo hicieron muy bien. Están por tener una "hija dotora" jajaja, que mas? Más allá, del chiste, gracias por pasarme este afecto por la ciencia, por llevarme al laboratorio cuando tenía no más de 3 años a jugar con soluciones y tubos de ensayo. Quiero que sepan que la pase muy bien estos años de la carrera. Fui feliz, soy feliz. Gracias Mamá, gracias Papá! Los quiero más que mucho!

Esta tesis se la dedico a mis abuelos. A Raúl, a Baby y a Nelly. Sé que están por acá todavía. No se van a ir nunca, al menos no de mi corazón. Sé que por ahí andan, el abu Baby refunfuñando por alguna cosa, como cuando hacíamos ruido a la hora de la siesta en Don Bosco, pero en el fondo estabas inmensamente feliz de que estuviéramos los cuatro niños corriendo por el jardín (sin romper las plantas, obvio). El abu Raúl con alguna de las mil anécdotas de tu legendaria vida, con tu corazón gigante, con tu paciencia infinita, con las Titas y Rodhesias que traía "el Sr". La abuela Nelly con el amor de abuela, con los tallarines y el pollo del domingo, con las milanesas de los viernes, con los cajones llenos de botones, cierres, cintas de colores, bijou y fotos, con tus fuerzas a la distancia en cada examen. Sé que estás mandando buenas vibras en este momento. Los quiero! gracias por dar inicio a todo esto.

Toda la Tierra es una sola alma,

y somos parte de ella.

No podrán morir nuestras almas.

Cambiar, si que pueden;

pero no apagarse.

Somos una sola alma,

como hay una sola Tierra.

Toda la Tierra- Canto Mapuche

Abel Kurüuinka

A Raúl, Baby y Nelly.

INTRODUCCIÓN 1
El suelo 1
Diversidad de microorganismos en el suelo 2
Estudio de la diversidad microbiana del suelo: del cultivo a la pirosecuenciación .. 3
Ecología de comunidades: el estudio de la biodiversidad 13
Biogeografía: microorganismos en el mapa 14
Metacomunidades 16
Modelos neutrales o de nicho 18
Los microorganismos en los procesos del suelo y ciclado de nutrientes 19
Degradación primaria 19
Procesos del nitrógeno 20
Mineralización de fósforo 21
Los ecosistemas agrícolas y el deterioro del suelo 22
Ecosistemas agrícolas en la Región Pampeana Argentina 23
La agricultura de conservación y la siembra directa 25
Soilgene: consorcio interdisciplinario para el estudio de la biología de suelos argentinos 25
Objetivos Generales 27
CAPÍTULO I -Parte A 28
Materiales y Métodos 29
Sitios y muestreo 29
Análisis físico-químicos 32
Extracción de ADN 32
Preparación de bibliotecas de amplicones 32
Secuenciación de bibliotecas de amplicones 33
Procesamiento y análisis de secuencias obtenidas 34
Análisis numéricos 35
Resultados 36

Patrón de diversidad beta de las comunidades microbianas con y sin historia de manejo agrícola 36
Relación de las variables del suelo con el patrón de comunidades 37
Diferencias en la composición taxonómica de las comunidades de suelos con y sin historia de manejo agrícola 39
Discusión 41
CAPÍTULO I -Parte B 46
Materiales y Métodos 47
Sitios, muestreo, propiedades de suelo y extracción de ADN 47
Preparación de bibliotecas para "shotgun sequencing" 47
Secuenciación de bibliotecas 47
Procesamiento y análisis de secuencias obtenidas 48
Resultados 49
Discusión 53
CAPITULO II 58
Materiales y Métodos 59
Sitio y muestreo 59
Análisis físico-químicos 61
Extracción de ADN y preparación de bibliotecas y secuenciación 61
Procesamiento de secuencias y análisis numéricos 61
Resultados 62
Patrón de diversidad beta de las comunidades microbianas de suelos bajo siembra directa y labranza convencional 62
Relación de las variables del suelo con el patrón de comunidades 63
Diferencias en la composición taxonómica de las comunidades de suelos bajo labranza convencional y siembra directa 64
Diferencias de los perfiles metabólicos de microbiomas de suelos bajo labranza convencional y siembra directa 65
Discusión 69
CAPÍTULO III 74

Materiales y Métodos 75
Consideraciones metodológicas 75
Determinación de factores contemporáneos e históricos 75
Distribución de la abundancia de especies, procesos neutrales o de nicho..... 75
Sitios y muestreo 76
Análisis físico-químicos..... 80
Extracción de ADN y preparación de bibliotecas y secuenciación 80
Procesamiento de secuencias y análisis numéricos 80
Resultados 83
Visualización del patrón de diversidad beta y agrupamientos 83
Partición de la diversidad beta y correlación de variables históricas y contemporáneas 91
Procesos de nicho o neutrales..... 94
Discusión 97
CONCLUSIONES 101
ANEXO 104
BIBLIOGRAFÍA..... 108

INTRODUCCIÓN

El suelo

El suelo es la capa mas externa de la corteza terrestre, es la interfase entre la atmósfera y la litósfera. Esta capa está compuesta por cinco ingredientes principales: minerales, materia orgánica, organismos vivos, gases y agua. Los minerales están divididos en tres tipos: arenas, arcillas y limos. Los porcentajes de estos tres componentes definen la textura del suelo. La materia orgánica está compuesta por restos de microorganismos, animales y plantas en descomposición y es un ingrediente crítico de la composición del suelo. La cantidad de materia orgánica es, sin duda, uno de los mejores indicadores de la calidad agronómica y fertilidad de un suelo [1].

El suelo es uno de los principales proveedores de servicios al ecosistema [2]. Es el depósito de nutrientes y agua para las plantas terrestres; previene de inundaciones; filtra contaminantes; regula la emisión de gases y principalmente cicla y recicla elementos y moléculas esenciales para la vida (Figura 1).

***Figura 1*: Procesos y servicios ambientales del suelo. Adaptado de Needelman, 2013 [1].**

Por sobre todas las cosas, los suelos son hábitat de una numerosa diversidad de organismos. Muchos de estos servicios para el ecosistema se están perdiendo por degradación y pérdida de suelos en algunos lugares del mundo. Es uno de los principales retos para la humanidad durante este siglo conservar, optimizar y restaurar los servicios ambientales del suelo [3].

Diversidad de microorganismos en el suelo

El suelo es probablemente el ambiente más desafiante para el estudio por parte de los microbiólogos debido a la alta diversidad de especies microbianas que en él habitan. Se estima que un gramo de suelo de bosque contiene $4x10^7$ células procariotas, mientras que un gramo de suelo agronómico o de pastura contiene $2x10^9$ células [4]. Estudios de re-asociación cinética de ADN extraído de distintos genomas procariotas han estimado que existen entre 2.000 y 18.000 genomas por gramo de suelo [5, 6]. Al haber excluido especies raras del estudio, estos números pueden ser aún subestimaciones de la realidad.

Los microorganismos no solo usan al suelo como hábitat y fuente de recursos y energía, sino que contribuyen a su formación influenciando sus características físicas y químicas y al resto de los organismos, sobre todo vegetales, que crecen en él. A su vez y en viceversa, la variación de los factores de formación de suelo (clima, topografía, historia geológica y uso por parte del hombre) determinan los factores físicos y químicos del suelo que influencian a los organismos que en él habitan.

La estructura del suelo es uno de los factores más influyentes sobre las comunidades de microorganismos. La formación de complejos entre la arcilla y la materia orgánica y la estabilización de agregados formados por partículas de arcilla, limo y arena, conforman la estructura de la matriz del suelo. El tamaño de los agregados es de 20-250 µm para microagregados y mayores a 250 µm para macroagregados [4, 7]. Los microorganismos del suelo suelen estar adheridos a partículas de suelo como granos de arena o complejos de materia orgánica y arcilla. Se generan así distintos micro-hábitats que incluyen a las paredes de los agregados y también el espacio de poros dentro y entre ellos [8, 9]. La estructura va a determinar además la cantidad de humedad retenida por el suelo y la conformación de gradientes de disponibilidad de agua en los micro-hábitats.

La materia orgánica es la principal fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos y puede variar en cantidad y en composición química. Esta depende de factores como el tipo de vegetación, clima, material parental del suelo, nivel de drenaje y la actividad de los microorganismos. La combinación de estos factores definirá la cantidad de sustancias húmicas presentes en la materia orgánica. El tipo de composición de la materia orgánica determina el grado de disponibilidad para los microorganismos: a mayor cantidad de sustancias húmicas, más recalcitrante se vuelve. Los materiales orgánicos provenientes de desechos vegetales de árboles caducifolios o de heces animales suelen poseer sustancias orgánicas más lábiles.

Mientras que los rastrojos de coníferas, por ejemplo, poseen mayor cantidad de lignina y polifenoles que son de más difícil acceso para los microorganismos [10].

El pH del suelo es otra característica importante ya que va a determinar la disponibilidad de iones escenciales para el metabolismo de los microorganismos. El nivel de fósforo disponible también depende del pH, siendo mayor a pH 6-7. La supervivencia de los microorganimos a distintos pHs está bien documentada; la mayoría de los microorganismos crecen a pH entre 4 y 9, aunque está reportada la existencia de organismos acidófilos en suelos que crecen a pHs cercanos a 1 [10].

Entonces, el metabolismo y la supervivencia de los microorganismos del suelo están relacionados directamente con la disponibilidad de agua y de nutrientes. La compleja estructura del suelo, genera un nivel de heterogeneidad de hábitats donde nutrientes y agua tienen distintos grados de disponibilidad, esto se observa tanto a escala microscópica como a nivel del paisaje. Es sabido que la gran biodiversidad de microorganismos encontrada en los suelos está ligada a esta amplia variedad y gradiente ambiental. Sin embargo, aún es necesario mucho trabajo para la llegar a comprender los procesos que generan la biodiversidad de microorganismos del suelo.

Estudio de la diversidad microbiana del suelo: del cultivo a la pirosecuenciación

Como se dijo en la sección anterior el estudio de la diversidad del suelo es un uno de los retos más desafiantes para los microbiólogos. La principal dificultad que enfrenta la ecología microbiana de suelos está dada por la gran diversidad de organismos, pero también por la complejidad del ambiente. A su vez la ecología microbiana, en comparación con la ecología de macroorganismos, se encuentra limitada por la cantidad y calidad de teorías ecológicas específicas para microorganismos [11].

La mayor limitación que enfrentaron históricamente los ecólogos microbianos y microbiólogos fue la imposibilidad de observar a los microorganismos. Se ha dependido de los cultivos de laboratorio para ello; pero solo entre el 0,1% a 1% de los microorganismos del suelo pueden ser cultivados usando técnicas estándar de laboratorio [5, 12]. Debido a esto solo una pequeña porción del pool de diversidad de microorganismos del suelo ha sido caracterizado [13]. Se han realizado innumerables esfuerzos para mejorar las técnicas de cultivo, en la mayoría de los casos con gran éxito [14-16]; sin embargo el gran avance en el estudio de la diversidad de microorganismos del suelo, se dio al empezar a usar técnicas independientes de cultivo basadas en análisis de ácidos nucléicos [17-20]. El análisis de ADN extraído

directamente de suelo permite obtener información de la composición genética y filogenética de la comunidad de microorganismos que en él habitan. Estos análisis se realizan mediante la amplificación de marcadores conservados que permitan definir filogenia y/o taxonomía de los microorganismos presentes en la muestra estudiada. Para reconstruir relaciones filogenéticas es necesario que la secuencia de ADN amplificada refleje la distancia evolutiva entre los microorganismos. Para Bacteria y Arquea suele utilizarse como marcador el gen de la subunidad ribosomal 16S [21-23]. Woese fue el primero en utilizar secuencias de genes de 16S ARNr para construir árboles filogenéticos [24]. La elección de este marcador se basa en que es buen cronómetro evolutivo: está presente en todos los organismos y algunas zonas de la secuencia se encuentran bien conservadas (ideales para diseñar primers) y otras son divergentes [25]. Se han utilizado también otro marcadores como ser dnaK33 (gen de la chaperona HSP-70) [26], amoA, nifH y otros genes del metabolismo de nitrógeno cuyas filogenias ya están definidas [27, 28], sin embargo el gen de 16S sigue siendo el más utilizado para análisis de comunidades microbianas de suelos.

Existen varios métodos para analizar la información genética obtenida por amplificación del gen de ARNr 16S. El primer método (Figura 2) consiste en el armado de bibliotecas mediante el clonado de las secuencias obtenidas en vectores. Los clones son secuenciados mediante la técnica de Sanger, o de primera generación [29, 30]. Las secuencias obtenidas pueden ser clasificadas taxonómicamente o utilizadas para reconstrucciones filogenéticas. La desventaja principal de esta técnica es su falta de practicidad, ya que se estima que para poder obtener una representación adecuada de la diversidad microbiana de una muestra de suelo se deben realizar más de 10.000 reacciones de secuenciación independientes, lo que es equivalente a analizar más de 10.000 clones [31].

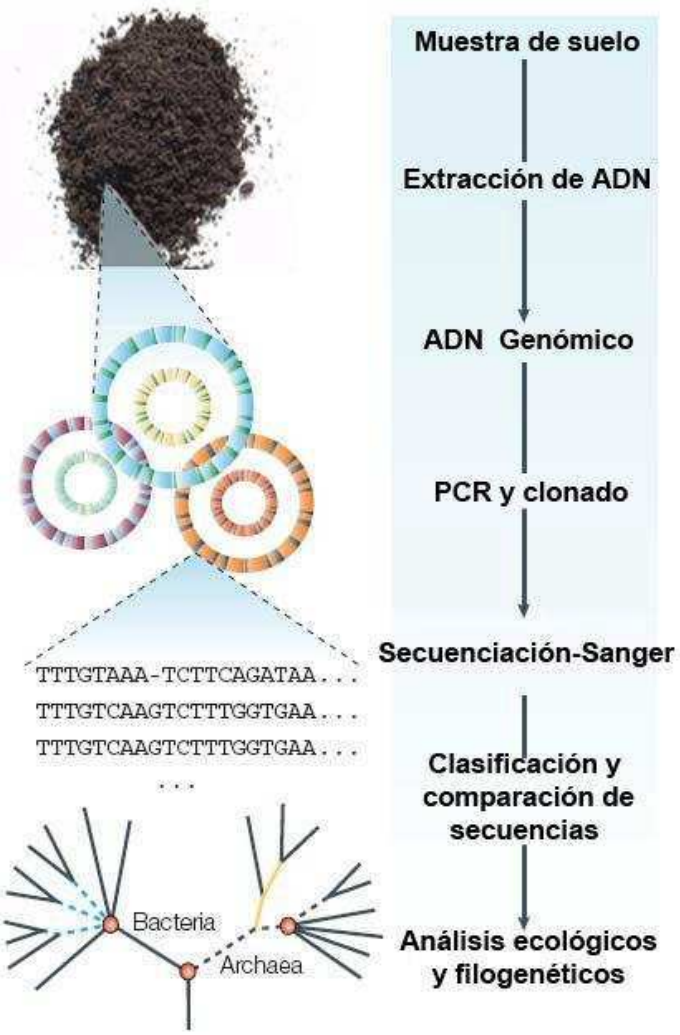


Figura 2: **Análisis de diversidad microbiana dependiente de PCR y clonados. Adaptado de Green et al. 2005 [32].**

Otros métodos de análisis de secuencias marcadores se basan en análisis de huellas genéticas digitales o *fingerprints*. Estos métodos aprovechan diferentes propiedades de las secuencias amplificadas como ser: su longitud, presencia o ausencia de sitios de restricción, estructura, etc. Son métodos rápidos que permiten análisis comparativos entre comunidades de microorganismos. Entre los métodos más utilizados podemos mencionar al Análisis de Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Terminales de Restricción (T-RFLP) [33, 34] y la Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE) [35].

Para la técnica de DGGE el ADN es extraído de las muestras de suelo y amplificado por PCR con primers específicos que contienen una secuencia llave (*clamp*) que permite que la molécula permanezca en el extremo como doble cadena. Luego las muestras se corren en un gel de poliacrilamida con un gradiente creciente de

concentración de agentes desnaturalizantes (formamida y uréa). Esta electroforésis permite la separación de las moléculas amplificadas de ADN según su secuencia: las diferencias en nucleótidos implican diferencia en el grado de desnaturalización alcanzado por las moléculas. La especificidad en el grado de desnaturalización permite obtener así un perfil genético representativo de las comunidades analizadas. Las bandas diferenciales obtenidas pueden ser escindidas del gel y secuenciadas mediante la técnica de Sanger. La principal desventaja que tiene esta técnica, es que si bien los perfiles son específicos de cada muestra, no se pueden adjudicar las bandas del gel a taxones únicos. Los fragmentos de ADN pueden tener las mismas características de movilidad incluso perteneciendo a especies distintas, de esta manera un conteo de bandas estaría subestimando la diversidad. Por este motivo no es un buen método cuantitativo de diversidad [36].

El análisis por T-RFLP consiste en la digestión del ADN con una enzima de restricción. Se obtiene de esta forma un perfil de tamaño de fragmentos de ADN que es específico de cada muestra analizada. Los perfiles son revelados en electroforesis en geles de poliacrilamida. Es una técnica que permite comparación entre comunidades pero que no es útil para evaluar diversidad o detectar grupos taxonómicos específicos [36].

La principal ventaja de los métodos de huella genética es su simplicidad y rapidez. Son buenos para comparación entre comunidades, pero como ya se mencionó son débiles para estimar diversidad y composición taxonómica.

Para entender los procesos que suceden en el suelo también es importante estudiar la diversidad funcional de las comunidades microbianas. El estudio de las capacidades metabólicas de las comunidades del suelo dependió también, como el estudio de la biodiversidad, de aislamientos y cultivos selectivos en el laboratorio. Se han desarrollado numerosas pruebas bioquímicas para detectar distintas actividades enzimáticas y metabolismos microbianos. Una de las más utilizadas es el ensayo de BIOLOG™, que consiste en un set de palcas de 95 sustratos a los cuales se expone la muestra ambiental. Se puede determinar así un perfil fisiológico de las comunidades (CLPP) presentes en las muestras evaluadas. La principal desventaja de este método es la limitada cantidad de evaluaciones. Además los resultados muestran las actividades metabólicas de los organismos que más rápido responden en las placas, no *in situ* en su ambiente de origen [37]. Para superar estas complicaciones, el estudio de las capacidades metabólicas y funcionales de las comunidades microbianas del suelo comenzó a basarse, también, en el análisis de ácidos nucléicos. La metagenómica estudia los genomas presentes en una comunidad ambiental. No se

limita solo a una región particular o gen, sino que intenta dilucidar todas las características metabólicas de las comunidades microbianas.

Los primeros pasos en la metagenómica de suelos fueron los mismos que para la determinación de biodiversidad usando herramientas moleculares. Para acceder a los genomas de los microorganismos era necesario preparar bibliotecas. Para ello se extrae ADN directamente de la muestra de suelo y luego de una digestión con enzimas de restricción o ruptura mecánica, se clona en vectores (Figura 3) [38]. Si bien este proceso parece sencillo, el tamaño del metagenoma de una muestra de suelo hace que la cantidad de clones a evaluar para tener una representación robusta del mismo sea enorme. La etapa de *screening* de los clones se vuelve así una tarea muy laboriosa. El *screening* puede ser funcional, expresando las secuencias clonadas en organismos huésped (e.g. *Escherichia coli*); o puede basarse en la inferencia de la función mediante la secuenciación del fragmento de ADN clonado.

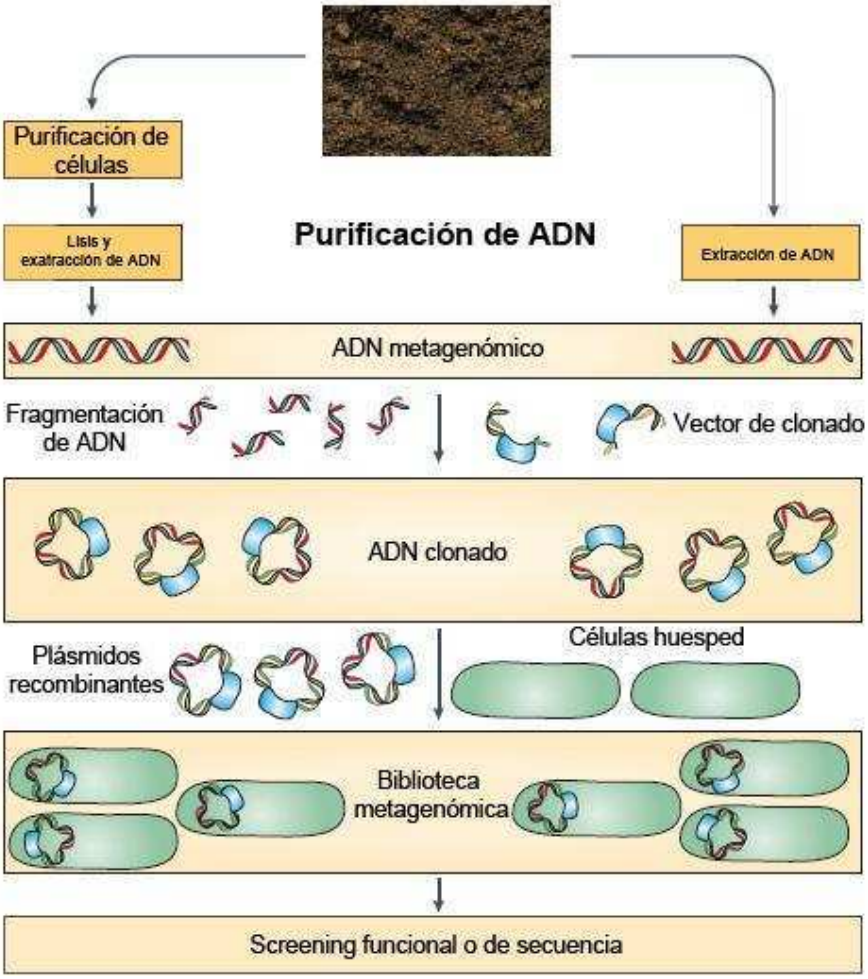


***Figura 3*: Construcción de bibliotecas metagenómicas. Adaptado de Daniel, 2005 [38].**

La llegada de los sistemas de secuenciación por síntesis o pirosecuenciación [39] de alto rendimiento dieron solución a la mayoría de los problemas arriba mencionados para el análisis de la diversidad de suelos. Las tecnologías de secuenciación de segunda generación se volvieron un método simple, rápido y barato para el análisis de comunidades microbianas en comparación con los laboriosos métodos basados en bibliotecas de clones [40]. También resuelven parte de los problemas de los análisis de *fingerprint* ya que permiten la identificación de todas las secuencias, obteniéndose así una cuantificación correcta de la diversidad microbiana. Los investigadores comenzaron entonces a utilizar estos métodos para el análisis de comunidades microbianas de suelos [41-43].

La principal ventaja de las tecnologías de segunda generación es su capacidad de generar millones de secuencias representantes de una comunidad microbiana sin la necesidad de armar bibliotecas de clones (Figura 4). Por ejemplo, con la tecnología de 454-Roche [44] pueden obtenerse hasta 1,3 millones de secuencias de un largo promedio de 400-600pb en cada corrida de secuenciación, comparado con las 96 secuencias de una placa completa en el sistema de Sanger. Por otro, lado el método permite el etiquetado de ADN generando la posibilidad de secuenciar múltiples muestras a la vez. En resumen, en un primer paso del método de 454-Roche, el ADN de suelo es fragmentado mecánicamente. Luego copias clonales de los fragmentos son producidas por PCR en emulsión sobre perlas de 28 µm (i.e. cada perla tendrá un solo fragmento original de ADN copiado miles de veces). Luego de romper la emulsión, las perlas son tratadas con un desnaturalizante para recuperar sólo ADN simple cadena. Se hibridiza después un *primer* de secuenciación a cada molécula de ADN presente en las perlas. A continuación se produce la pirosecuenciación. Para ello las perlas son depositadas en una picoplaca con pocillos de tamaño tal que quede depositada una perla única por pocillo. La secuenciación se produce por síntesis, cada ciclo consiste en la introducción de uno de los cuatro nucleótidos mediante una polimerasa. A su vez la incorporación es seguida de la adición de luciferina, la cual emite luz. Esta señal lumínica, que es capturada por una cámara, indica la adición del nucleótido en cada pocillo. Se producen suficientes ciclos de A,G,C,T para completar secuencias de un promedio de 500 pb [45] (Figura 5).

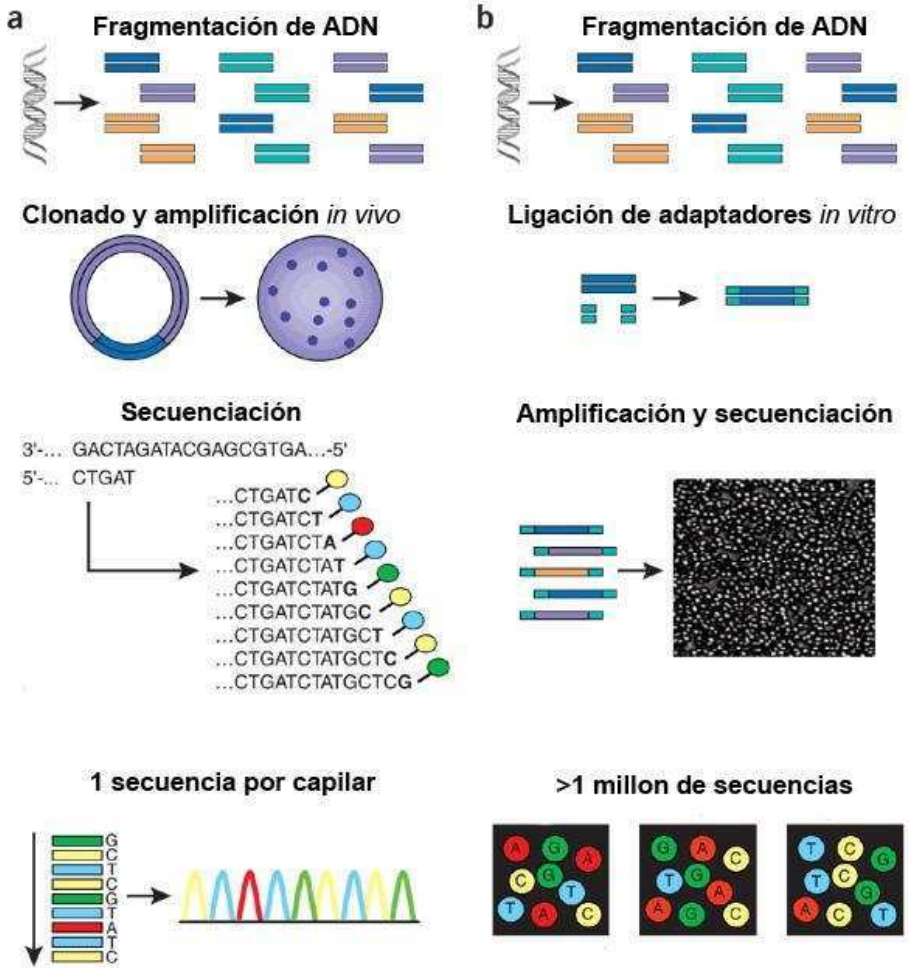


***Figura 4*: Comparación entre métodos de secuenciación de primera (a) y segunda (b) generación. Adaptado de Shendure et al. 2008 [45].**

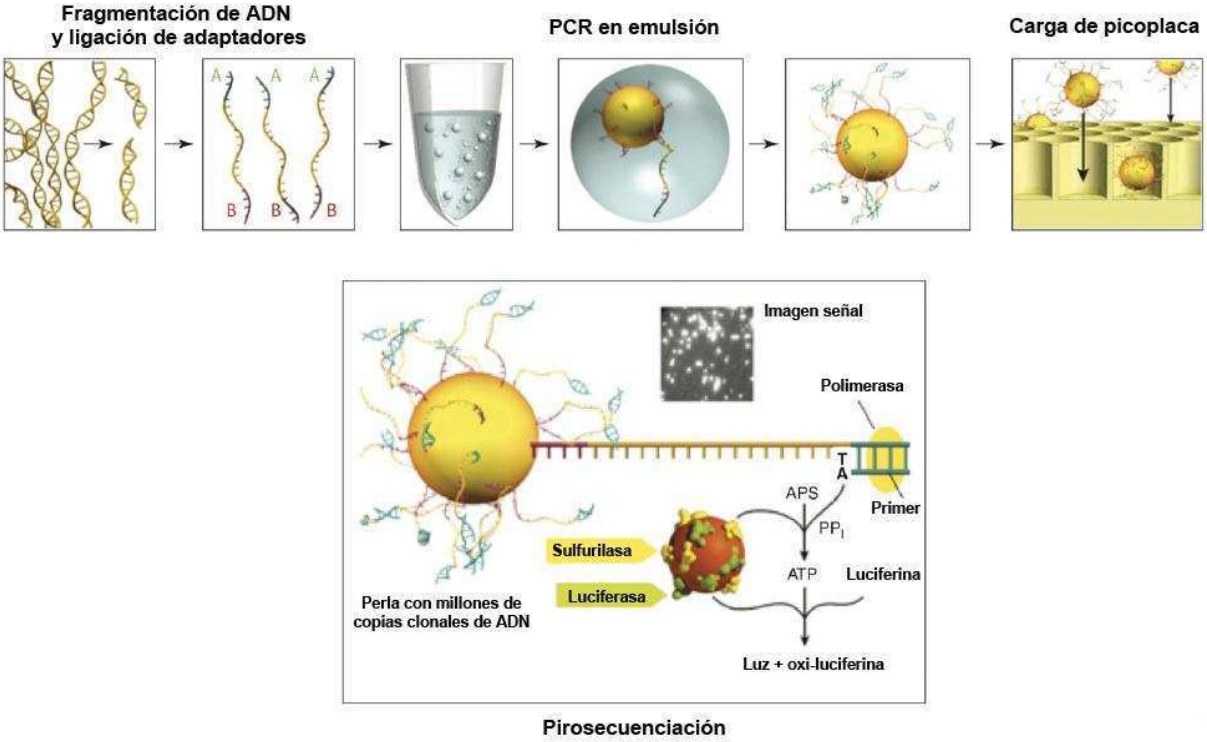


Figura 5: Protocolo de secuenciación para el método de 454-Roche. Adaptado de Mardis, 2008 [46].

Para el análisis de comunidades microbianas se utilizan dos enfoques de secuenciación de alto rendimiento: *amplicon sequenicing* y *shotgun* (Figura 6). El primero se basa en la amplificación de un gen o región de un gen de interés. Para el estudio de diversidad y composición de comunidades microbianas el gen de 16S ARNr sigue siendo el marcador más utilizado. Sin embargo por la limitación en la longitud de las secuencias producidas se amplifica solo una región del gen. El gen de 16S ARNr consiste en secuencias conservadas espaciadas por secuencias variables que incluyen nueve regiones hiper-variables (V1-V9) (Figura 7). Alguna de estas regiones o combinaciones de ellas se eligen como, entonces, como amplicón. La región V4 ha sido muy utilizada ya que el proyecto Ribosomal Data Base Project [47], de recolección de datos de diversidad basados en el gen 16S ARNr, ha propuesto la misma y ha diseñado y publicado uno de los primeros pares de primers para usar con la tecnología de 454- Roche. Usar solo una porción del gen de 16S ARNr produce pérdida de sensibilidad respecto de usar el gen entero, sin embargo es posible identificar altos niveles taxonómicos y la cantidad de información obtenida y la robustez del análisis que puede obtenerse, superan esta desventaja [48].

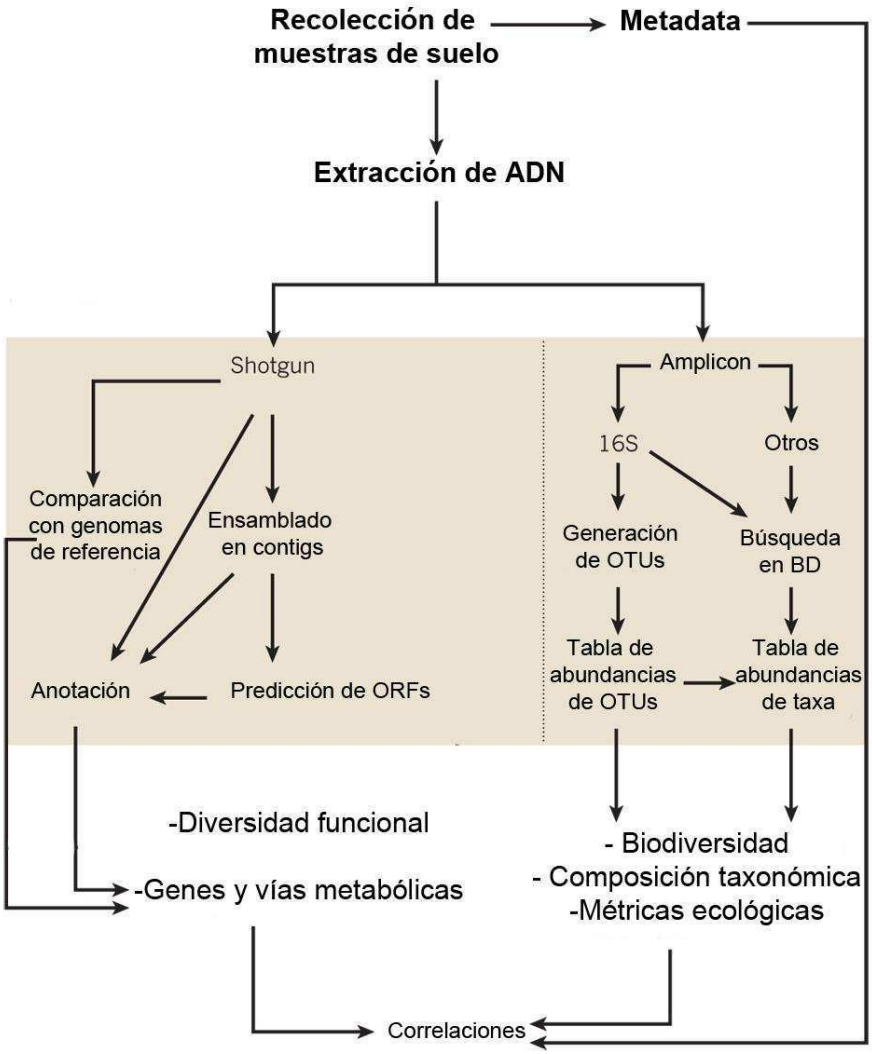


***Figura 6*: Esquema de un proyecto de análisis de diversidad microbiana de suelos utilizando tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Adaptado de Weinstock, 2012 [48].**

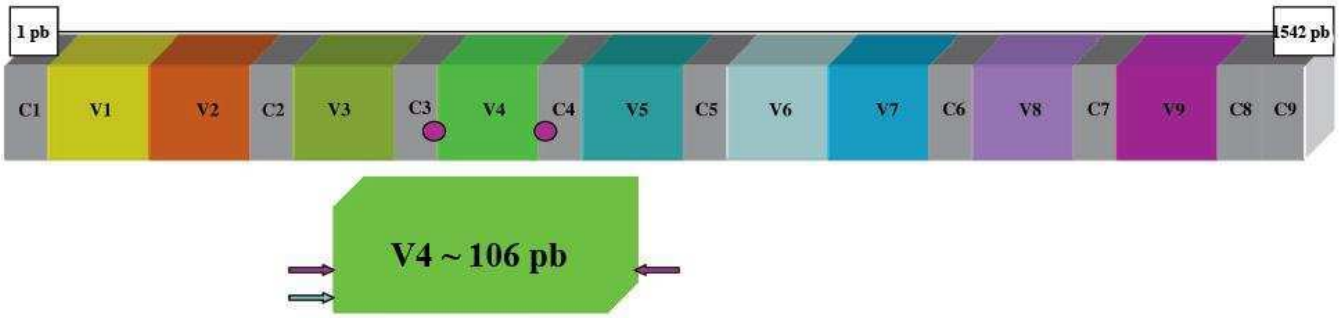


***Figura 7*: Estructura de las regiones variables y conservadas del gen de ARN ribosomal 16S. Adaptado de Petrosino et al. 2009 [49].**

Para el análisis de biodiversidad basado en amplicones 16S pueden seguirse dos caminos: analizar un perfil de la diversidad de la comunidad y/o analizar su composición taxonómica. La forma más intuitiva de determinar el perfil de diversidad es cuantificar las especies presentes, pero definir especies entre microorganismos no es tarea sencilla [50]. Una solución para este problema es definir unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés). Suele utilizarse el 97% de similitud entre secuencias para definir un OTU (para Bacteria y Arquea). Existen distintos métodos para agrupar secuencias en OTUs y se dividen entre: aglomerativos, divisivos y de partición [51, 52]. Por su lado, los métodos de clasificación taxonómica más utilizados suelen seguir alguna de las siguientes estrategias: a) alineamientos pareados contra un set de secuencias de referencia con identidad taxonómica conocida (e.g. BLAST) [53]; b) comparación de la composición de las lecturas con una referencia de entrenamiento utilizando “k-meros”, o “palabras” de una n longitud de pares de bases [54];o c) métodos basados en filogenia que asignan la clasificación buscando la secuencia más cercana en una filogenia de referencia [55].

La estrategia de *shotgun* se utiliza para análisis metagenómicos que incluyen el estudio de la diversidad funcional de las comunidades microbianas (Figura 6). Esta se basa en la secuenciación directa del ADN genómico extraído de las muestras de suelo. El análisis de las secuencias metagenómicas producidas se centra en su anotación funcional. Para ello el primer paso es la identificación de marcos de lectura abiertos (ORF). Un ORF bacteriano promedio es codificado por aproximadamente 900 nucleótidos, una longitud mayor que la de las secuencias generadas por las tecnologías de pirosecuencuación. Existen dos métodos para identificar ORFs en secuencias cortas. El método más sencillo se basa en búsqueda por homología (e.g. BLAST) contra una base de datos [56]. El segundo método utiliza algoritmos de predicción de genes [57-59]. Los péptidos predichos necesitan ser luego comparados contra una base de datos de referencia para asignarles una anotación funcional. Entre las bases de datos más utilizadas se encuentran las de *Gene Ontology* (GO) [60], la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) [61], el sistema de *Cluster of Orthologus Groups* (COG) [62] y la base de datos basada en subsistemas SEED [63]. El proceso de asignación funcional puede realizarse utilizando varios servicios gratuitos brindados por distintas instituciones [64-66]. La clasificación taxonómica de secuencias de metagenomas generados por pirosecuenciación también es posible y suele realizarse por homología utilizando, por ejemplo, BLAST o modelos ocultos de Markov (HMMM) [67].

En resumen las nuevas tecnologías de secuenciación han traído grandes ventajas al estudio de la microbiología de suelos y a la determinación y análisis de su diversidad. Es por ello que están siendo cada vez más utilizados por distintos grupos de investigación en todo el mundo. En el presente se encuentran en desarrollo varios proyectos internacionales con el objetivo de analizar la biodiversidad de suelos utilizando herramientas de última generación. Entre ellos se destacan: "TerraGenome" [68], "DeepSoil" y los proyectos llevados a cabo por el Departamento de Energía de los Estados Unidos [69]. Todos ellos tienen como objetivo caracterizar la biodiversidad y taxonómica y funcional de distintos tipos de suelos: de praderas, de bosques, agrícolas, etc. Además estudiaran los efectos de distintos fenómenos sobre las comunidades microbianas: cambios de clima, efecto invernadero y emisión de gases, manejos agrícolas y otro disturbios generados por el hombre.

Ecología de comunidades: el estudio de la biodiversidad

La biodiversidad de un ambiente o hábitat se estudia en el marco de la ecología de comunidades. Por definición una comunidad es un grupo de especies que interaccionan en un lugar determinado en un tiempo determinado. Para el análisis de comunidades microbianas hablaremos de OTUs en vez de especies.

Se han definido tres niveles de diversidad para el estudio de comunidades. La *diversidad alfa* se refiere a la diversidad de un hábitat o sitio. La *diversidad beta* se refiere a la diversidad entre hábitats o sitios. Finalmente la *diversidad gama* se encarga de la diversidad a grandes escalas y combina componentes de la diversidad alfa y beta [70]. Nosotros nos vamos a basar en el estudio de la diversidad beta ya que los objetivos del trabajo son principalmente comparativos.

Whittaker definió a la diversidad beta como la variación en la composición de especies entre sitios dentro de una región o área de interés [70]. El número, identidad y abundancia de especies define la composición de una comunidad. Whittaker también definió que la diversidad beta puede medirse a partir de la presencia-ausencia de especies o a partir de los datos cuantitativos de abundancia. Si la diversidad beta se mide entre pares de sitios esta puede variar de par a par. Para analizar este tipo de variaciones se utilizan distancias ecológicas. La ventaja del uso de distancias es que se puede resumir la variación en la composición de especies en un solo valor; la desventaja es que se pierde la información sobre la identidad de las especies. Una buena distancia ecológica es la que logra describir las diferencias entre la composición

de especies. Para sitios que comparten la mayoría de las especies la distancia será pequeña, mientras que para los sitios con pocas especies en común la distancia será grande. Existen numerosas posibilidades para el cálculo de distancias ecológicas (Figura 8). Las distancias pueden clasificarse de varias formas. Por ejemplo por el tipo de valor que se calcula: hay distancias que se miden en el intervalo entre cero y uno. Cuando los valores son cercanos a cero los sitios comparados tiene una composición similar de especies, mientras que si el valor se acerca a uno implica que la composición varía entre sitios. Las distancias de Bray Curtis y Kulczynski se encuentran entre las de este tipo. Otras distancias calculan valores no restringidos, que pueden ser mayores a uno. Este es el caso de las distancias euclidiana y de Hellinger. Otras medidas de distancia tienen en cuenta solo las diferencias en presencia y ausencia de especies, entre ellas: Jaccard y Sorenson [71].

Bray-Curtis: $$D = 1 - 2\frac{\sum_{i=1}^{S}\min(a_i, c_i)}{\sum_{i=1}^{S}(a_i + c_i)}$$

Kulczynski: $$D = 1 - \frac{1}{2}\left(\frac{\sum_{i=1}^{S}\min(a_i, c_i)}{\sum_{i=1}^{S}a_i} + \frac{\sum_{i=1}^{S}\min(a_i, c_i)}{\sum_{i=1}^{S}c_i}\right)$$

Euclidiana: $$D = \sqrt{\sum_{i=1}^{S}(a_i - c_i)^2}$$

Hellinger: $$D = \sqrt{\sum_{i=1}^{S}\left(\sqrt{\frac{a_i}{a_+}} - \sqrt{\frac{c_i}{c_+}}\right)^2} \quad \text{con } a_+ = \sum_{i=1}^{S}a_i$$

***Figura 8*: Fórmulas para el cálculo de de distancias ecológicas entre dos sitios hipotéticos A y C. Donde a corresponde *a* indica la abundancia de especies en el sitio A y *c* la abundancia de especies en el sitio C. Adaptado de Kindt, 2005 [71].**

Biogeografía: microorganismos en el mapa

La biogeografía abarca el estudio de la biodiversidad en el espacio y en el tiempo. Su objetivo es determinar donde viven los organismos, cual es su abundancia, y cuál es la causa de la misma. Intenta explicar los mecanismos que generan y mantienen la biodiversidad, como ser la especiación, la extinción, la dispersión y las interacciones

entre organismos [72]. Desde el siglo XVIII que los ecólogos se ocupan del estudio de la biogeografía de animales y plantas, sin embargo el estudio en microorganismos fue posible a partir de la aparición de técnicas independientes de cultivo que revelaron la verdadera magnitud de la diversidad [23, 73]. Existe, sin embargo, un debate sobre si hay realmente un patrón biogeográfico de microorganismos [74, 75].

Uno de los principales objetivos de la biogeografía es poder discernir entre la influencia de factores contemporáneos, como son los factores ambientales, y factores históricos. En este marco se pueden distinguir cuatro hipótesis alternativas [76]. La primera sería la hipótesis nula que dice que la distribución de los microorganismos es obra del azar. La segunda hipótesis está a favor de los factores ambientales contemporáneos. Esta hipótesis es concordante con el postulado de Baas-Becking para taxones microbianos que dice que "todo está en todas partes, pero el ambiente selecciona" (en inglés: "*everything is everywhere but environment selects*", y en holandés, idioma original: "*alles is overal: maar het milieu selecteer*t") [77]. Que el "ambiente selecciona" implica que ambientes con características actuales diferentes presentan ensambles microbianos diferentes, mientras que "todo está en todas partes" implica una capacidad de dispersión enorme, universal, que dejaría sin efectos de eventos evolutivos y ecológicos pasados. La tercera alternativa predice que la variación espacial es debida solo a los efectos de eventos pasados. Estos efectos incluyen las limitaciones en la dispersión y condiciones ambientales anteriores. La cuarta hipótesis sugiere que la distribución de los taxones microbianos, al igual que la de macroorganismos, es consecuencia de ambos tipo de efectos: los pasados y los ambientales contemporáneos. Poder distinguir entre estas cuatro hipótesis nos lleva a las dos grandes preguntas de la biogeografía. Primero: ¿existen diferencias espaciales de los ensamblajes microbianos?, en otras palabras: ¿tienen biogeografía los microorganismos? Segundo: Si existe la diferencia espacial, ¿se debe esta a procesos históricos o a las condiciones ambientales actuales, o ambas? Por definición la diferencia entre los ensambles microbianos se deberá a la variación en las abundancias relativas de los taxones, incluyendo la ausencia en un sitio y su presencia en otro.

La respuesta a la primera pregunta fue encontrada hace tiempo para microorganismos patógenos y simbiontes, la variación en su distribución está ligada a las de sus huéspedes [78-80]. En cuanto a los microorganismos de vida libre, ya se tiene suficiente evidencia para indicar que también varían en abundancia, distribución y diversidad a distintos niveles taxonómicos y escalas espaciales [81-85]. Estas observaciones demuestran que la primera hipótesis, al menos en esos casos, no es correcta, la distribución no es por azar.

En cuanto a la segunda pregunta, varios autores ya han puesto a prueba las otras 3 hipótesis. Los trabajos se han llevado a cabo para distintos ambientes, niveles taxonómicos y escalas espaciales [86-90]. Para distinguir entre las 3 hipótesis sobre los efectos contemporáneos (i.e. ambientales) o históricos en la estructura de las comunidades, recientemente Hanson et al. revisaron la bibliografía disponible en el tema [91]. Los autores encontraron que ambos procesos influyen en los patrones biogeográficos de los microorganismos. Vieron que la mayoría de los estudios (92,6%) encontraron correlaciones significativas con las variables ambientales estudiadas, demostrando que la selección impuesta por el ambiente actual es importante. Por otro lado, vieron que un 68% de los trabajos revisados reportaron correlaciones significativas con procesos históricos, incluyendo los límites en la dispersión como factor principal.

Metacomunidades

Uno de los posibles marcos teóricos para estudiar los procesos que influyen en el patrón espacial de las comunidades microbianas es la Teoría de Metacomunidades. El concepto propuesto por Hanski y Gilpin evolucionó desde la Teoría de Metapoblaciones [92]. Dentro de este contexto teórico, se define como metacomunidad a un grupo de comunidades interconectadas entre sí por la dispersión de múltiples especies que, potencialmente, pueden interactuar entre sí. En oposición a las visiones tradicionales, el concepto de metacomunidades permite explicar la dinámica espacial de las comunidades en función de procesos ecológicos que ocurren tanto a escala de organización local como regional.

Por su parte Leibold et al. propusieron cuatro paradigmas para metacomunidades: (i) el *modelo neutral*, (ii) las *dinámica de parches ("patch dynamics")* ; (iii) el *efecto masa ("mass effect")* ; y (iv) el *ordenamiento de especies ("species sorting"*) (Figura 9) [93]. Estos cuatro marcos han sido la base del estudio de metacomunidades y la mayoría de los trabajos se han basado en determinar cuál es el grado en que el sistema de estudio se acopla a estas opciones [94].

El *modelo neutra*l predice que la estructura de las comunidades depende totalmente de factores demográficos estocásticos [95]. Este paradigma define que todas las especies son similares en cuanto a sus habilidades competitivas, movimiento y fitness. Las dinámicas de diversidad de las especies están basadas meramente en las probabilidades de pérdida (extinción y emigración) y ganancia (especiación e inmigración) de especies.

El *ordenamiento de especies* ,por su lado actúa sobre el supuesto de que los parches de hábitat cambian según las condiciones ambientales [96]. Para este modelo la dispersión es ilimitada (i.e. todas las especies pueden llegar a todos los parches). Las diferencias de las habilidades de las distintas especies para "adecuarse" a las condiciones ambientales permiten la convivencia a nivel regional basada en diferencias de nicho y de explotación de recursos.

El modelo de *efecto masa* se basa en la inmigración y emigración en las dinámicas de poblaciones. Las especies pueden ser rescatadas de la exclusión de comunidades en donde son malas competidoras ("sumidero") por acción de la inmigración de individuos desde las comunidades donde son buenas competidoras ("fuente") [97, 98]. Este paradigma hace énfasis en el rol de las dinámicas espaciales sobre la densidad de las poblaciones, y por ende sobre las comunidades. Asume que los parches de hábitat están interconectados por efectos de la dispersión frecuente.

El modelo de *dinámica de parches* asume que todos los parches son capaces de contener poblaciones, sin embargo pueden estar o no ocupados. La diversidad local de especies es limitada por dispersión [99].

En resumen lo que diferencia a los tres últimos paradigmas es el nivel de dispersión entre las comunidades dentro de la metacomunidad en análisis. La dispersión es *limitada* o *baja* para algunas especies de la comunidad en el marco de *dinámica de parches;* es *alta* en el marco del modelo de *ordenamiento de especies;* y es *eficiente* en el marco de *efecto masa [100]*.

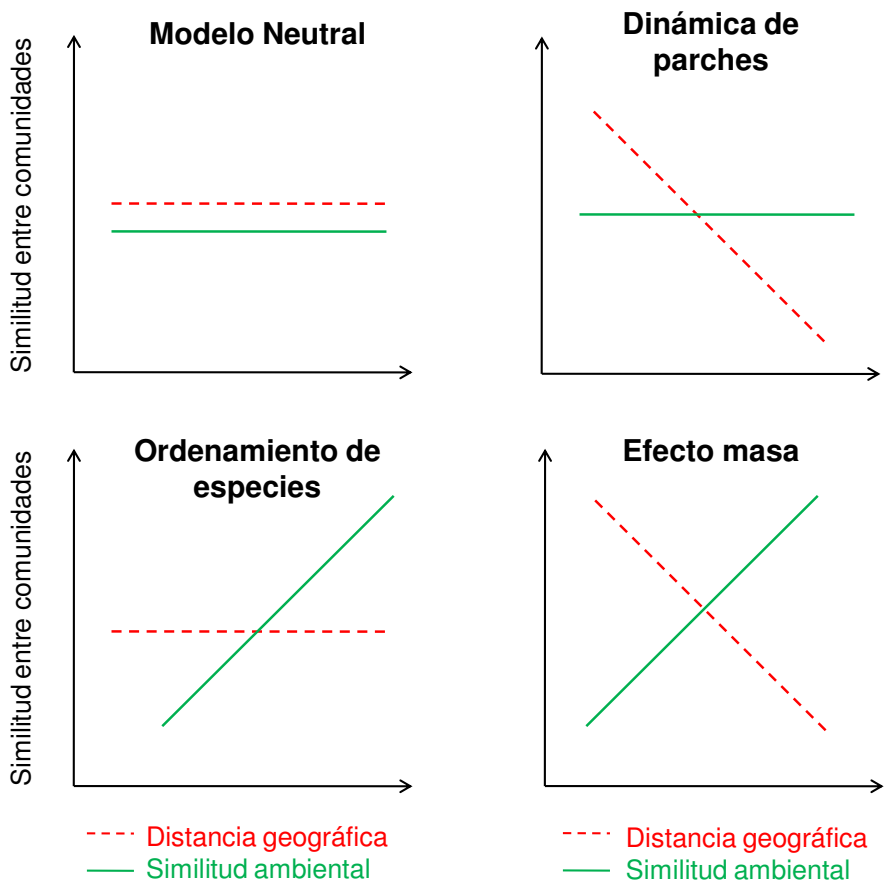


***Figura 9*: Paradigmas en el marco de Metacomunidades. Contribución de los efectos de la distancia entre hábitats y de las condiciones ambientales sobre las comunidades.**

Los paradigmas hablan de "especies" porque fueron enunciados para macroorgaismos. En el caso de los microorganismos la unidad de diversidad será el OTU o algún nivel taxonómico determinado.

El marco teórico de Metacomunidades ha sido utilizado para determinar qué factores influyen en la distribución de la diversidad de microorganismos [88, 90, 101-104]. Los resultados de estos trabajos demostraron la importancia de ambos tipos de factores sobre las metacomunidades microbianas. Las tendencias hacia factores ambientales o históricos fluctuaron dependiendo de las escalas geográficas y los niveles taxonómicos analizados pero sin un patrón claro [91].

Modelos neutrales o de nicho

La *Teoría Unificada Neutral de Biodiversidad y Biogeografía* planteada por Hubbel se basa en que la diversidad de mantiene a causa de que los procesos de extinción y especiación están balanceados y que las tasas demográficas (nacimiento, muerte, dispersión y especiación) de las especies son iguales en comunidades en donde las

especies son ecológicamente equivalentes. Por lo tanto la estructura de una comunidad se define por procesos estocásticos y por limitación en la dispersión [95].

Si la dispersión en la metacomunidad es fuerte, la comunidad local va a ser un reflejo de la comunidad a nivel regional. Si en cambio la dispersión es débil, los procesos estocásticos demográficos que sufre cada comunidad local harán que con el tiempo estas comunidades se diferencien cada vez más pero en una forma impredecible. Esto es lo que el modelo llama deriva ecológica (*ecological drift*). Se predice además que un número limitado de individuos pueden habitar una comunidad local. A esto se lo denomina supuesto de suma-cero: si la comunidad esta "llena" un individuo nuevo solo puede establecerse si otro muere.

Por su lado la teoría de nichos dice que las especies poseen distintas características ecológicas y que la generación de la diversidad es principalmente por causa de las interacciones existentes entre las especies (competencia, predación, etc.). Los modelos de nicho también tienen en cuenta la interacción con el ambiente [105]. Los modelos de nicho postulan que las especies se establecen en distintos hábitats en la medida que cumplan con los requerimientos fisiológicos y aptitudes biológicas adecuadas para ese sitio; y que, eventualmente, sean competitivamente superiores. La teoría de nicho predice entonces que diversidad de especies dentro de una comunidad estaría determinada por “filtros” ambientales y su relación con las estrategias y rasgos ecológicos y funcionales de las especies [106, 107].

Los microorganismos en los procesos del suelo y ciclado de nutrientes

Degradación primaria

Entre el 80 y el 90% de la producción primaria (i.e. materia orgánica generada por autótrofos) entra al suelo en forma de restos de plantas y raíces. Los descomponedores primarios de materia orgánica son los microorganismos. Los hongos son los descomponedores más importantes y abundantes, sin embargo las bacterias cumplen su parte. La ventaja de los hongos sobre las bacterias se debe a que las células bacterianas suelen tener baja movilidad y una vez que agotan los recursos del microambiente circundante se vuelven metabólicamente inactivas hasta que vuelven a ser enfrentadas a nutrientes [10].

El proceso de descomposición requiere de complejas interacciones en la red trófica del suelo, donde se modifican las formas químicas de las moléculas de nutrientes. Las

tasas de descomposición varían entre y dentro de los ecosistemas en distintas escalas. Como se mencionó anteriormente el tipo de composición de la materia orgánica determina el grado de disponibilidad para los microorganismos: a mayor cantidad de sustancias húmicas, más recalcitrante se vuelve. La composición de la materia orgánica se define principalmente por la composición de los residuos depositados sobre el suelo. Sustratos lábiles, como los azúcares y el almidón son fácilmente consumidos por microorganismos, mientras que taninos, ligninas y otros compuestos ricos en polifenoles pueden solo ser utilizados en forma directa por ciertos organismos especializados.

Procesos del nitrógeno

La mineralización de nutrientes consiste en el paso de formas insolubles y solubles de materia orgánica en compuestos inorgánicos en manos de microorganismos. Este es un proceso crítico dentro del funcionamiento de los ecosistemas ya que determina la disponibilidad de nutrientes para plantas y otros microoganismos. La mayoría del N en los suelos se encuentra formando parte de la materia orgánica en forma de moléculas complejas, insolubles y/o recalcitrantes (proteínas, quitina, polímeros de carbohidratos, sustancias húmicas, etc.). Estas moléculas no pueden atravesar las membranas microbianas y son degradadas por enzimas extracelulares. Esta degradación primaria genera la formación de materia orgánica soluble o disponible (e.g. aminoácidos) [10].

La mayoría de la materia orgánica soluble o disponible (i.e. no recalcitrante) es absorbida por microorganismos del suelo. La utilización de estos compuestos orgánicos depende de las limitaciones de C y N. En condiciones donde el crecimiento es limitado por la cantidad de C, los microorganismos usan mayoritariamente C y excretan amonio como desecho. Este NH_4^+ es luego mineralizado por otros microorganismos del suelo. Cuando las demandas de N son altas los microorganismos captan mayor cantidad de NH_4^+ y NO_2^- y entonces el N es inmovilizado en su biomasa, disminuyendo la cantidad de nitrógeno inorgánico para las plantas. El NH_4^+ producido de la mineralización puede ser absorbido por las partículas de arcilla del suelo de carga negativa y/o puede ser oxidado por organismos nitrificadores para producir NO_2^- y NO_3^- [10]

La nitrificación es un proceso de dos pasos. El primero consiste en la oxidación del NH_4^+ a NO_2^- por parte de bacterias oxidadoras de amonio (AOB) y arqueas oxidadoras de amonio (AOA) [108, 109]; y el segundo paso consiste en la oxidación de NO_2^- a

NO_3^- por parte de bacterias oxidadoras de nitrito (NOB) [110]. Mientras que las AOB se encuentran casi restringidas a los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus* del phylum *Proteobacteria*; las NOB están más ampliamente distribuidas entre el phylum *Nitrospira* y los géneros *Nitrobacter, Nitrotoga, Nitrococcus, Nitrospina* del phylum *Proteobacteria* [111-113].

Las plantas y los microorganismos consumen el NO_3^- producido por nitrificación, sin embargo una parte puede perderse por desnitrificación o lixiviación. Los iones positivos como NH_4^+ son retenidos por absorción en partículas de arcillas con carga negativa, sin embargo los iones NO_3^-, cuando no son utilizados por microorganismos o plantas, son lavados del suelo. La desnitrificación es la reducción de NO_3^- a NO, N_2O y N_2 gaseosos. Es un proceso llevado a cabo por amplia variedad de microorganismos y suele darse en condiciones de alta cantidad de C y bajo oxígeno. No son deseables altas tasas de desnitrificación debido a que el N_2O es uno de los principales gases del efecto invernadero que favorece a la disminución del ozono en la estratósfera [10].

La principal forma que tienen las plantas de obtener N es mediante la fijación. Generalmente esta es la vía primaria por la cual el N entra en el sistema [114]. La fijación del N es llevada a cabo por microorganismos que convierten N_2 a NH_3 y lo incorporan a aminoácidos y proteínas. Estos microorganismos pueden ser de vida libre o simbiontes. Los segundos forman nódulos en las raíces de las plantas de quien reciben carbohidratos y energía, a cambio entregan aminoácidos. Los fijadores más conocidos son representantes de los géneros *Rhizobium*, del phylum *Proteobacteria,* y *Frankia* del phylum *Actinobacteria* [28, 115, 116]. Estas asociaciones simbióticas son de suma importancia en ecosistemas naturales y agrícolas y sus beneficios para la fertilidad del suelo son ampliamente conocidos [117, 118].

Mineralización de fósforo

A diferencia del N el fósforo se encuentra mayormente en formas inorgánicas insolubles en el suelo. Estas moléculas son inaccesibles para las plantas. Los microorganismos juegan su rol importante ya que solubilizan P inorgánico y mineralizan P orgánico. La mineralización está a cargo principalmente de fosfatasas que rompen las uniones éster de las moléculas liberando PO_4^{3-} que puede ser consumido por plantas y microorganismos.

La mineralización de P va a depender del balance C:P. Cuando este supera el valor de ~100, el P es inmovilizado por microorganismos con alto requerimiento de P; un 2% es

mineralizado por bacterias y solo un 0,05- 0,5% queda disponible para las plantas. Así el pool de P orgánico mineralizado en la biomasa microbiana alcanza el orden de 20-30%, un valor muy alto comparado con el 1-2% de C y el 10-20% de N [119]. La función de "fuente" de P por parte de los biomasa microbiana va a depender de los factores ambientales, manejo del suelo y fertilización [10].

Los ecosistemas agrícolas y el deterioro del suelo

La "agriculturización" es un caso particular de cambio en el uso de la tierra que acarrea una transformación del ecosistema. Un creciente número de evidencias da cuenta de las consecuencias de la expansión agrícola sobre el clima; el balance de carbono, nitrógeno y otros nutrientes; las emisiones de gases traza con efecto invernadero; la biodiversidad y el balance hídrico [120-122]. Entre las principales consecuencias de la "agriculturización" se destacan: 1) que las actividades asociadas con la agricultura son responsables de un tercio de las emisiones de gases del efecto invernadero [123]; 2) que los suelos erosionados y el exceso de nutrientes agregados por fertilización son lavados a los cuerpos de agua, degradando la calidad del agua y afectando su biodiversidad [124]; y 3) que el reemplazo de los procesos naturales de mantenimiento de la fertilidad por fertilización externa, han generado una dependencia de los ecosistemas agrícolas a la misma [125].

El futuro de la agricultura acarrea problemas que intensificarán los efectos ya vistos en el ecosistema, a menos que se tomen acciones al respecto. Se estima que la producción agrícola deberá ser al menos duplicada para hacer frente a los requerimientos alimenticios y energéticos de los próximos 50 años [126, 127]. El desafío es lograr este objetivo sin aumentar los riesgos para el ambiente. Se ha hecho mucho trabajo para caracterizar y evaluar los impactos mundiales de la agricultura, sobre todo sobre la calidad del suelo [128, 129]. Es sabido que los procesos ecológicos que mantienen a los ecosistemas dependen de la variedad y diversidad de organismos [130]. Estudios microbiológicos y genéticos han demostrado que es más grande la variedad de organismos de un suelo sano que toda la diversidad de plantas y animales del mundo. A su vez, la variedad de formas en que los nutrientes y sustancias del suelo pueden ser procesados por los microorganismos constituyen un sistema autosuficiente que puede adaptarse a los cambios ambientales [131]. El desafío es, entonces, comprender el comportamiento de este sistema, el valor no está en la cantidad de carbono, nitrógeno, fósforo y otros nutrientes, sino en los flujos de sus forman en el ambiente que son modulados por procesos ecológicos y biológicos

(Figura 10). La introducción de la biología en el concepto de fertilidad de suelos ha sido un importante avance en este camino. Sin embargo se necesita un abordaje conceptual mayor para poder realizar un uso sustentable del suelo. Probablemente un ecosistema agrícola que se aproxime lo máximo posible a un ecosistema natural será el panorama necesario para poder aumentar la producción minimizando los efectos del uso. Llegar a este escenario mediante el uso de tecnologías requerirá, como ya se dijo, de un amplio conocimiento del sistema [125].

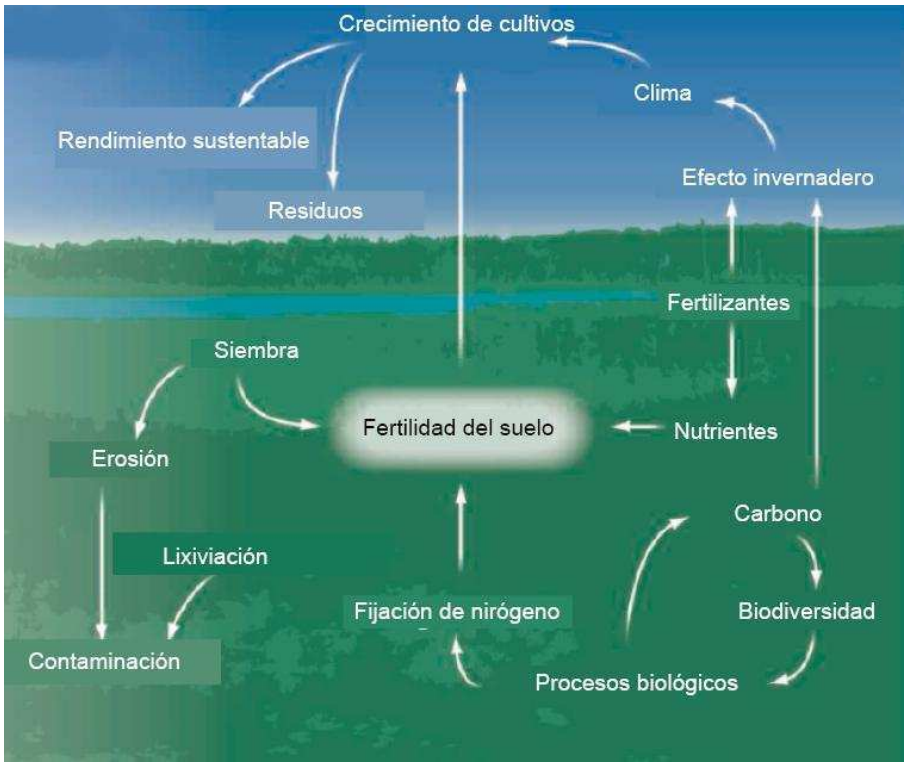


***Figura 10*: Cuadro conceptual de los elementos a ser estudiados, comprendidos y tenidos en cuenta para una agricultura sustentable. Adaptado de Scholes y Scholes, 2013 [125].**

Ecosistemas agrícolas en la Región Pampeana Argentina

La historia de la agricultura y de la fragmentación del paisaje en Región Pampeana se inició hacia finales del siglo XIX con la colonización de suelos con elevados contenidos de materia orgánica y una condición estructural óptima. Desde principios del siglo XX se produjo una fuerte expansión agrícola en La Pampa y sur de Córdoba que se suma a la ocurrida inicialmente en Buenos Aires, Santa Fe y Entre Ríos. Este período abarcó aproximadamente hasta 1940 y se caracterizó por un incremento de la vulnerabilidad de los suelos que se manifestó por el descenso del contenido de materia orgánica y

magnificación de los efectos de la erosión eólica e hídrica. A partir de 1970 los suelos de la región pampeana sufrieron una extraordinaria transformación de la actividad agrícola caracterizada por el gran aumento de la producción, adopción de moderna tecnología y desarrollo de nuevas formas organizativas de producción. Desde comienzos de la década del noventa se incentivó este proceso de "agriculturización" en coincidencia con la expansión del cultivo de soja [132].

La Región Pampeana se divide en las siguientes subregiones: Pampa Ondulada, Pampa Deprimida, Pampa Arenosa, Región Semiárida, Pampa Austral y Litoral y la historia de uso del suelo no ha sido igual en todas ellas. Las regiones se caracterizan por poseer diferentes características climáticas y edáficas. Por lo tanto no todas poseen el mismo porcentaje de superficie cultivada. Además la susceptibilidad a los procesos de erosión es diferente para cada subregión [133, 134].

En la actualidad, frente a la creciente demanda de alimentos y energía y con más de 25 millones de hectáreas bajo producción agrícola la Región Pampeana juega un importante papel a nivel mundial. Como ya mencionamos, el sostenimiento y aumento de la producción, manteniendo y minimizando los efectos nocivos sobre el ambiente y la biodiversidad, son un gran desafío.

En cuanto al estado del conocimiento de los agro-ecosistemas pampeaos, se conoce que la agricultura ha degradado el suelo por la erosión causada por el uso de labranza convencional, y ha generado pérdidas de nutrientes y carbono orgánico. [135-138]. Resultados recientes muestran que los sitios cultivados en la región pampeana poseen un 20% menos de carbono orgánico que los parques asociados sin historia agrícola [139]. El mismo estudio también encontró correlación entre la variación del pH y el uso agrícola. Hoy entre el 60% y 80% de la superficie cultivada se encuentra bajo siembra directa. Se han hecho numerosas investigaciones para evaluar los efectos de esta práctica en las propiedades físicas y químicas del suelo, contenido de agua, fertilidad y rendimientos [140]. Las principales conclusiones obtenidas sobre la implementación de la siembra directa en la región dan cuenta de la mejora del suelo, respecto de otras labranzas, sobre todo en los contenidos de materia orgánica en los primeros centímetros del perfil; pero alarman de la mayor necesidad de fertilización nitrogenada para mantener los niveles de nutrientes y rendimientos.

La agricultura de conservación y la siembra directa

En el año 2003 se definió el concepto de Agricultura de conservación (CA) por parte de la The Food and Agriculture Organization (FAO) [141]. El mismo incluye una lista de prácticas agrícolas que fomentan la sostenibilidad ambiental, económica y social de los procesos agropecuarios, promoviendo la producción de alimentos y productos agrícolas seguros y de calidad. Las bases de la CA son las siguientes: 1) Mínimo disturbio mecánico del suelo; 2) cobertura de suelo permanente; 3) Rotación de cultivos. En este texto cuando hablemos de *siembra directa*, vamos a hacer mención a sistemas de labranza que cumplan con los tres ítems arriba mencionados.

Los datos para Argentina hablan de un una adopción de la siembra directa de alrededor de 28 millones de hectáreas para el año 2011 (http://www.aapresid.org.ar/superficie/). Esto equivale al 78% de la superficie total cultivada.

Soilgene: consorcio interdisciplinario para el estudio de la biología de suelos argentinos

Frente a los desafíos planteados en la sección anterior se consolidó en el año 2009 el consorcio interdisciplinario *Soilgene*. En el marco del Proyecto de Áreas Estratégicas, (PAE 37164) se estableció el consorcio del cual formaron parte grupos de investigación de diferentes instituciones de Argentina. Participaron de *Soilgene* el grupo de la Dra. Godeas, con experiencia en biología de micorrizas arbusculares, el grupo de la Dra. Zelada, con experiencia en ingeniería genética de plantas, el grupo de la Dra. Novas dedicado a la biodiversidad de microorganismos endofíticos, los tres de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA); el grupo del Ing. Álvarez, con experiencia en el análisis de fertilidad de suelos, el grupo del Ing. Schrauf con experiencia en manejo y biología de forrajeras, ambos de Facultad de Agronomía- UBA; el grupo del Dr. Pardo, dedicado a la biología de ectomicorrizas, de la Universidad de Quilmes; el grupo de el Dr. Aguilar avocado al estudio del rol de los microorganismos en el ciclo del nitrógeno, de la Universidad Nacional de La Plata; y el grupo del Dr. Vázquez dedicado a genómica y bioinformática del Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR) representando al sector privado. El proyecto llevado a cabo por el consorcio se centró en dos objetivos principales 1) evaluar el impacto de la agricultura sobre ecosistemas agrícolas típicos de la Región Pampeana, con enfoque en el estudio de los procesos biológicos y diversidad

microbiana de los suelos, y 2) generar la primera base datos metagenómicos de suelos de la Argentina, con el fin de abrir la "caja negra" [142, 143] de los procesos del suelo y además generar un set de datos para la bioprospección de enzimas de interés biotecnológico. La base de datos metagenómicos fue denominada *Pampa Datasets* y ya se encuentra disponible para la comunidad científica [144]. Parte de los datos metagenómicos crudos del *Pampa Datasets* fueron utilizados en esta tesis.

Objetivos Generales

- Establecer los patrones de diversidad y la composición taxonómica de las comunidades microbianas de suelos de la Región Pampeana Argentina.

- Estudiar la variación de la estructura, composición taxonómica y perfil metagenómico de comunidades microbianas de suelos de la región frente a distintos usos del suelo.

- Avanzar en la comprensión de los procesos presentes en los suelos de ecosistemas agrícolas en pos del manejo sustentable de los suelos.

Los objetivos específicos serán enunciados en el comienzo de cada capítulo.

CAPÍTULO I -Parte A

Impacto de la agricultura sobre la estructura y composición de las comunidades microbianas del suelo.

El caso de la Pampa Ondulada.

El **objetivo** principal de este capítulo es analizar el impacto de la agricultura sobre comunidades microbianas de la Pampa Ondulada. Se comparará la estructura y composición de comunidades bacterianas de suelos con y sin historia de manejo agrícola.

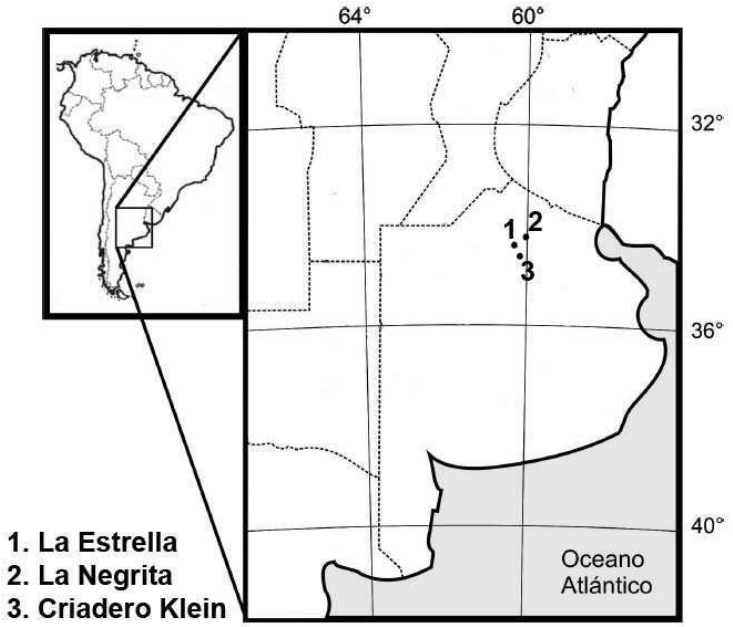
Son conocidos los efectos que el manejo agrícola ha generado en las propiedades físicas y químicas de suelos de la Pampa Ondulada. Frente a ello, **se hipotetiza** que estos cambios en las características del suelo han impactado en la evolución y adaptación de las comunidades microbianas y este efecto se verá reflejado en su estructura y composición.

Materiales y Métodos

Sitios y muestreo

Para esta primera etapa del trabajo se eligió evaluar suelos de la Pampa Ondulada por ser la subregión más productiva y con la más larga historia de manejo agrícola [145].

Las muestras se tomaron en Junio de 2010 en 3 establecimientos productivos. Los nombres de los establecimientos son: *La Estrella*, *La Negrita* y *Criadero Klein*. La figura 11 muestra la localización geográfica de los sitios de muestro.



Muestra	Latitud	Longitud
La Estrella- Agro	-34º 41´4,2"	-60º 6´ 2,4"
La Estrella- No Agro	-34º 39´ 27,6"	-60º 6´ 4,8"
La Negrita- Agro	-34º 34´ 46,2"	-59º 55´ 8,4"
La Negrita- No Agro	-34º 34´ 40,2	-59º 55´ 7,8"
C. Klein- Agro	-35º 7´17,4 "	-60º 15´ 42,6"
C. Klein- No Agro	-35º 6´1,8"	-60º 14´ 53,4"

Figura 11. **Localización geográfica de los sitios muestreados en la Pampa Ondulada.**

Los suelos muestreados son Argiudoles, de las series Chacabuco y O' Higgins [146]. La temperatura media anual de los sitios muestreados fue de 16,0℃ a 16,3℃ y la precipitación media anual fue de de 1027 mm a 1065 mm. Se tomaron muestras en lotes agrícolas y en los parques asociados a los cascos en cada establecimiento. Se

determinaron así dos tratamientos: suelos disturbados por agricultura, "Agro", y suelos no disturbados, "No Agro". La utilización de muestras de suelo de parques como tratamiento "referencia" o "control", en análisis de suelos de la Región Pampeana, es una práctica altamente difundida. Esto se debe a la falta de suelos prístinos, no disturbados, en la región debido al avance de la agricultura. Por ejemplo, Berhongaray comparó el contenido de carbono orgánico de suelos de pastizales naturales clausurados o con bajo nivel de pastoreo, con el contenido de suelos de parques en la Región Pampeana y no encontró diferencias significativas [139]. Este trabajo se realizó en el marco del proyecto Soilgene y parte de los sitios de muestreo de su trabajo coinciden con los puntos muestreados para esta sección. Los lotes agrícolas muestreados tienen una historia de al menos un siglo de agricultura bajo rotaciones de pasturas y cultivos de grano (trigo, maíz, soja) y al menos 15 años, los últimos, de agricultura bajo siembra directa. La última rotación antes del muestreo fue trigo-soja. Las muestras se recolectaron un mes después de la cosecha de soja. No se detectó historia de agricultura en los parques por al menos 30 años. Los datos de historia de los lotes y parques fueron recolectados en forma de entrevista con los responsables de los establecimientos. Los parques se encontraban cubiertos de especies vegetales herbáceas no leñosas*: Cirsium sp, Trifolium sp, Micropsis sp, Festuca sp, Dichondra sp, Cyperus sp* y *Taraxacum officinale*. Se tomaron en total 4 muestras en cada lote o parque. Para responder a los objetivos planteados se consideraron a los 3 establecimientos como unidades experimentales, por lo tanto se contó con 3 réplicas por tratamiento (figura 12). Para los análisis numéricos se tomo a cada establecimiento (unidad experimental) como un bloque en el que se midió la respuesta 4 veces. De esta forma se elimina del análisis la variación intra-sitio.

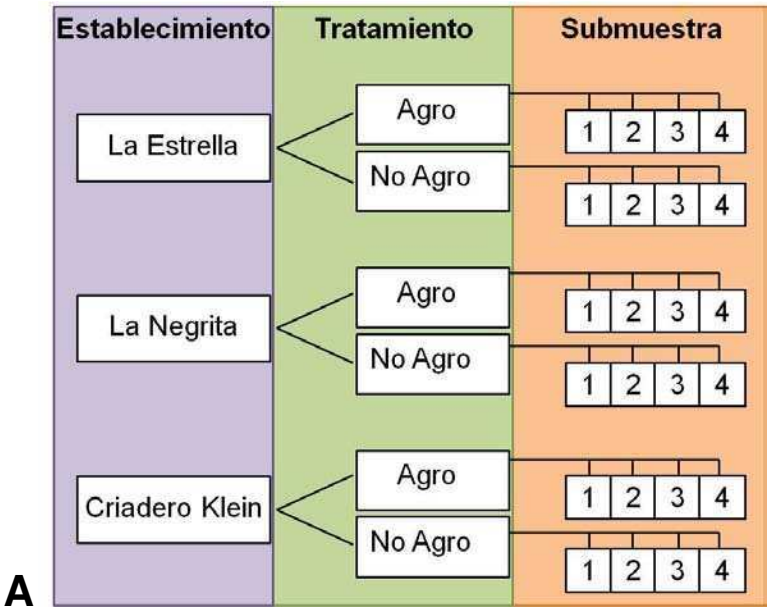


Figura 12: **A) Diseño de muestreo. B) Imagen representativa del tratamiento "No Agro" (parque). C) Imagen representativa del tratamiento "Agro" (lote agrícola). Las imágenes fueron tomadas en el establecimiento *La Estrella.***

Las muestras fueron tomadas de los primeros 20 cm de suelo con barreno diseñado para tal fin. Una vez recolectadas las muestras se mantuvieron en frío y fueron enviadas al laboratorio. Las muestras para extracción de ADN se conservaron a -80°C.

Análisis físico-químicos

Las mediciones de propiedades físicas y químicas de los suelos muestreados se realizaron, en colaboración con el grupo del Ing. Roberto Álvarez de la Facultad Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. La textura (i.e. % de arcilla, % de limo, % de arena) fue determinada por el método del hidrómetro [147]. El porcentaje de carbono orgánico fue determinado por el método de digestión húmeda [148]. El pH se calculó usando una solución suelo:agua de 1:2,5. La salinidad, o capacidad de intercambio catiónico, se calculó como medida de la conductividad eléctrica [149]. El fosforo extractable se determinó con el método de Bray [150]. El nivel de nitratos se analizó mediante extracción en KCL 2 M y el método del ácido fenoldisulfónico y el porcentaje de nitrógeno mediante el método de Kjeldahl [151].

Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN genómico de las muestras de suelo primero se dejaron secar sobre bandejas de plástico en un armario seco y en ausencia de luz durante 24 hs. La homogenización de las muestras se realizó luego mediante tamizado por 2 mm y 1 mm. Durante este proceso se eliminaron restos de tejidos vegetales, insectos y piedras. Se utilizaron 10 g de suelo por muestra para la purificación que se realizó con el kit PowerMax Soil DNA (MOBIO Lab. Inc., Cat: 12888-50) siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad del material extraído fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8%. Para la cuantificación se realizó el ensayo Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat: P7589) según el protocolo del fabricante.

Preparación de bibliotecas de amplicones

Con el ADN extraído se realizaron reacciones de PCR por duplicado para cada muestra utilizando con el fin de amplificar la región V4 del gen de 16S ARNr. Se usaron los primers F563: AYTGGGYDTAAAGNG y R802: TACCRGGGTHTCTAATCC, TACCAGAGTATCTAATTC, CTACDSRGGTMTCTAATC, TACNVGGGTATCTAATCC recomendados por el proyecto "Ribosomal Data Base Project" para pirosecuenciación [47]. Además a cada primer se le adicionó en el extremo 5´ una secuencia "etiqueta" o TAG para facilitar la adición de los adaptadores para secuenciación y los identificadores únicos (MIDS o barcodes) durante una segunda ronda de amplificación.

Las secuencias TAG fueron: TAG-Forward: CACGACGTTGTAAAACGAC, TAG-Reverse: CAGGAAACAGCTATGACC.

Una primera ronda de amplificación consistió en una reacción de PCR en un volumen final de 25 ul conteniendo 2,5 µl de Buffer de reacción FastStart High Fidelity 10X (Roche Applied Science, Cat: 03553426001), 20 ng de molde de ADN, 0,4 µM de cada primer, 1,25 U de enzima FastStart High Fidelity Enzyme Blend (Roche Applied Science, Cat: 03553426001) y 0,2 mM DNTPs. El programa de PCR fue 95 ℃ por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de 95 ℃ por 45 segundos, 57 ℃ por 45 segundos y 72 ℃ por 60 segundos y una elongación final a 72℃ por 4 minutos. Luego de esta primera ronda de amplificación, cada producto de PCR contenía la secuencia específica amplificada, flanqueada por las secuencias TAG en ambos extremos. Para adicionar los adaptadores necesarios para la secuenciación (Adaptador454) y los barcodes a cada muestra, se realizó una segunda ronda de PCR utilizando primers con la siguiente estructura: Primer Forward: AdaptadorFw454-MID-TAGFw, Primer Reverse: AdaptadorRv454-TAGRv. Las secuencias adaptadoras en los mismos fueron: AdaptadorFw454: CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG, AdaptadorRv454: CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG. La reacción contuvo: 3µl de Buffer de reacción FastStart High Fidelity 10X, 0,6 µl dNTPs, 2 µl de cada Primer (10µM), 0,9 µl de BSA, 1 µl de DMSO, 0,3 µl de enzima Taq Fast Start High Fidelity, 30µl de agua y 1 µl de molde de ADN producto de reacción de la primera ronda de PCR. El programa utilizado fue: 95℃ 5 minutos, (95℃ 30 seg, 72℃ 1 min) x 15 ciclos, 72℃ 5 minutos. El producto de las reacciones fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa 1%. Las reacciones se realizaron por duplicado para cada muestra y los productos, luego de la segunda amplificación fueron pooleados previo al paso de purificación. La purificación se realizó utilizando Ampure Beads (Agencourt, Cat N: A63880) para eliminar impurezas, productos espurios de pequeño tamaño y primers. Se cuantificó utilizando Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit. Se armó finalmente una solución única juntando los productos de todas las reacciones en cantidades iguales de masa para generar la biblioteca a secuenciar. La misma fue cuantificada nuevamente y diluida para generar una solución de trabajo con una concentración de $1x10^7$ moléculas de ADN/µl. Estos procedimientos fueron realizados de acuerdo a lo especificado en el manual Amplicon Library Preparation Method Manual de Roche-454 (http://454.com/my454/).

Secuenciación de bibliotecas de amplicones

Todos los pasos para la secuenciación se realizaron siguiendo los protocolos en los manuales de Roche-454 (http://454.com/my454/). La biblioteca fue titulada previo a la secuenciación. Para ello se realizaron amplificaciones por PCR en emulsión utilizando los procedimientos y reactivos especificados en el manual emPCR Amplification Manual - Lib-A SV. La preparación de las muestras para secuenciación fue realizada utilizando la cantidad de copias de ADN determinada en la titulación siguiendo los procedimientos detallados por los manuales emPCR Amplification Manual - Lib-A MV. La secuenciación de la biblioteca fue realizada de acuerdo a lo establecido por el manual Sequencing Method Manual en un secuenciador Titanium series de Roche-454.

Procesamiento y análisis de secuencias obtenidas

Para el procesamiento y análisis de los datos de secuencia se utilizó la plataforma QIIME -Quantitative Insights Into Microbial Ecology- [152]. El primer paso realizado fue el control de calidad y eliminación de ruido de las secuencias, para ello se utilizó el comando *ampliconnoise.py*. Este proceso también elimina quimeras[153]. Para cada muestra se obtuvieron 2.900 secuencias en promedio (entre 1.550 y 5.186). Luego se agruparon las secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) usando el comando *pick_otus.py* con el método de Uclust [51] y una similitud de secuencias del 97%. Las secuencias representativas de cada OTU se alinearon usando el algoritmo PyNast [154]. A continuación se construyó un árbol filogenético con las secuencias alineadas usando el método de FastTree [155]. A partir de este momento se utilizó una submuestra de 1.080 secuencias de cada muestra. Para ello se realizó una rarefacción al azar del 70% de la cantidad de secuencias de la muestra que menos secuencias tiene para equiparar el número de secuencias por muestra y poder hacer análisis comparativos. Se calcularon matrices de distancias filogenéticas entre OTUs usando los algoritmos unweighted y weighted UniFrac [156, 157]. Estas matrices se utilizaron como medida de la diversidad beta entre las comunidades de las muestras estudiadas. UniFrac, mide la distancia filogenética entre sets de OTUs como la fracción del largo de la rama del árbol que lleva al descendiente de una muestra o de la de otra, pero no de ambas. La versión *weighted* del algoritmo tiene en cuenta, además, las abundancias de OTUs en el cálculo de las distancias. Por último, se realizó la clasificación taxonómica de las secuencias representantes de cada OTU usando el clasificador bayesiano RDP Classifier [54] y usando la última versión de base de datos de Greengenes [158]. Para ello se utilizó un nivel de confianza de 50%, como

recomiendan los desarrolladores del clasificador para secuencias del tamaño del amplicon utilizado (~240 pb).

Análisis numéricos

La tabla de OTUs construida de la rarefacción (i.e. 1.080 secuencias por muestra) se utilizó para calcular la diversidad beta entre comunidades microbianas. Se calcularon matrices de similitud basadas en la distancia de Bray- Curtis que tiene en cuenta tanto la ausencia y presencia de OTUs como su abundancia (Magurran 2005). Las matrices de diversidad beta, tanto basadas en Unifrac como en Bray Curtis, se utilizaron para el cálculo de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). El análisis de PCoA permite la visualización de las distancias entre muestras (o sitios). El objetivo de un análisis de ordenamiento es representar datos multivariados, como ser la abundancia de OTUs y la distancia ecológica entre comunidades, en un número reducido de ejes ortogonales (Borcard, Gillet et al. 2011). En un gráfico de ordenamiento los puntos que representan a las muestras se ubican en forma tal que las distancias entre ellos representan la distancia ecológica entre las comunidades muestreadas (Kindt and Coe 2005). Para determinar la presencia significativa de estructuras o agrupamientos en los datos de diversidad beta se utilizaron los test no paramétricos ANOSIM (Clarke 1993) y PERMANOVA (Anderson 2001), con 999 permutaciones.

Se utilizó el test BIOENV (Clarke and Ainsworth 1993) para determinar que variables físico-químicas del suelo correlacionaron mejor con el patrón de diversidad beta calculado. Como se obtuvo un solo valor por cada variable físico-química evaluada por lote o parque, los datos de OTUs y distancias de las submuestras fueron promediados para este análisis. La tabla con las variables físico-químicas fue centrada y estandarizada utilizando "Z- scores". Se utilizó el test de Mantel, con 999 permutaciones, para evaluar la significancia de las correlaciones encontradas.

Las diferencias en la composición taxonómica se calcularon mediante pruebas de Student de una cola. Los cálculos se hicieron sobre las abundancias relativas respecto del total de OTUs. Todos los análisis numéricos se calcularon usando los paquetes "stats", "vegan" y "BiodiversityR" del entorno R (R Core Team 2013)

.

Resultados

Patrón de diversidad beta de las comunidades microbianas con y sin historia de manejo agrícola

La visualización por PCoA de las distancias calculadas entre las comunidades muestreadas permitió distinguir un patrón que divide a las comunidades entre provenientes de suelos con o sin historia de manejo agrícola (i.e. entre Agro y No Agro) (Figura 13). Este patrón se observó para todas las distancias utilizadas, tanto unweighted Unifrac, como weighted Unifrac y Bray Curtis.

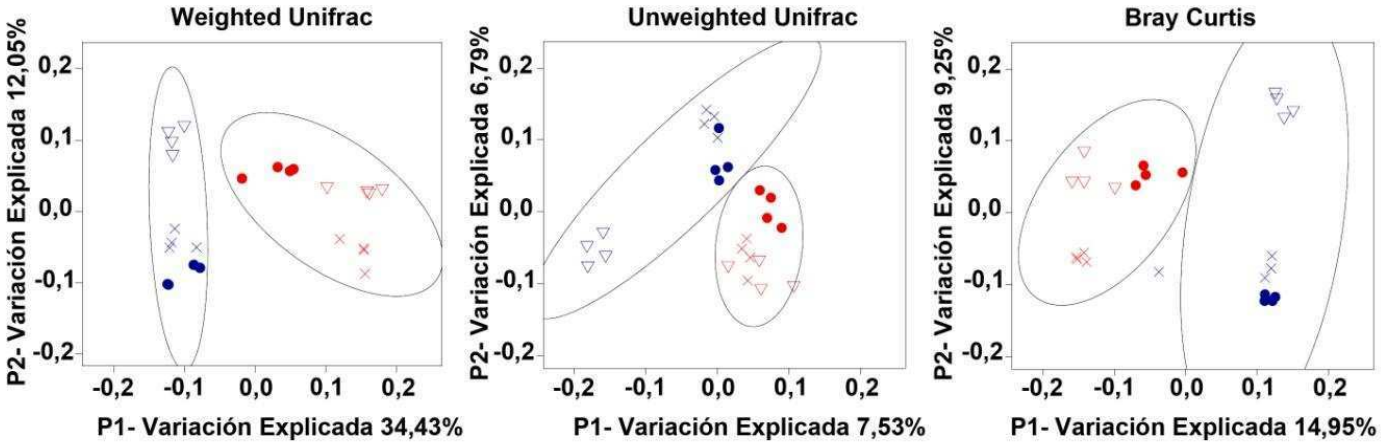


***Figura 13*: Patrón de diversidad beta de las comunidades de suelos Agro (Rojo) y No Agro (Azul) en la Pampa Ondulada. Los puntos corresponden a muestras tomadas en *La Estrella*, los triángulos a muestras de *La Negrita* y las cruces muestras de *Criadero Klein*. Las elipses determinan un límite de confianza de 95%.**

La significancia de la división en grupos por tratamientos se verificó mediante dos pruebas estadísticas no paramétricas: ANOSIM y PERMANOVA. Para todos los casos el valor de p fue significativo. (Tabla 1). El estadístico en la prueba ANOSIM puede interpretarse como un coeficiente que indica el grado del agrupamiento. Valores cercanos a uno indicarán un agrupamiento fuerte, mientras que al acercarse a cero indicarán menor correlación de los datos con los grupos planteados *a-priori* [71]. En este caso se observó un alto valor de R para las distancias que tienen en cuenta la abundancia de OTUs (i.e. weighted Unifrac y Bray Curtis) y menor valor para unweighted Unifrac que solo tiene en cuenta ausencia y presencia de OTUs. Este resultado da cuenta del peso que tiene la abundancia de OTUs en el patrón de agrupamiento de las comunidades. En otras palabras, las diferencias entre comunidades de suelos Agro y No agro no se encuentran solo a nivel de que OTUs

están presentes en cada caso, sino también, y principalmente, en sus abundancias. Este resultado se observó también al usar la prueba PERMANOVA. El valor de R^2 fue mayor en los casos que se evalúan distancias que tienen en cuenta la abundancia de OTUs. Otra evidencia importante del peso que tiene la diferencia en las abundancias es la cantidad de variación explicada por los ejes del grafico de PCoA. El ordenamiento basado en weighted Unifrac explica, en sus dos primeros ejes, más del 45% de la variación entre comunidades, mientras que el análisis basado en unweighted Unifrac solo explica un 14,32% de variación. En concordancia, el ordenamiento basado en similitud de Bray Curtis explica un 24% de variación. La diferencia entre la variación explicada al utilizar una métrica que tiene en cuenta distancias filogenéticas y otra que no (i.e. weighted Unifrac vs. Bray Curtis) indica que existe divergencia evolutiva entre comunidades de suelos Agro y No agro. Unifrac permite evidenciar el nivel de divergencia entre OTUs al cuantificar los distintos grados de similitud entre secuencias, y de esta forma capta el total de evolución único para cada muestra [156].

***Tabla 1*: Significancia del agrupamiento de las comunidades según el tratamiento: *Agro* o *No Agro* para las distintas distancias evaluadas.**

Test/ Distancia	Weighted Unifrac	Unweighted Unifrac	Bray Curtis
ANOSIM R	**0,84**	**0,45**	**0,74**
ANOSIM p	**0,001**	**0,001**	**0,001**
PERMANOVA R2	**0,30**	**0,07**	**0,13**
PERMANOVA p	**0,001**	**0,001**	**0,001**

Relación de las variables del suelo con el patrón de comunidades

Utilizamos el test de BIOENV para evaluar la correlación de las variables físico-químicas del suelo con el patrón observado para las comunidades microbianas de la Pampa Ondulada (Tabla 2). Los resultados indicaron que los niveles de materia orgánica, de arcilla y limo, de nitratos, de fosforo extractable y el pH fueron las variables que mejor correlacionaron con el patrón de comunidades definido para weighted Unifrac (Mantel $r= 0,6107$, $p\leq 0,05$). En un grafico de PCoA del tipo biplot se

observó que la materia orgánica, los nitratos y el fosforo extraíble correlacionaron con el primer eje del ordenamiento, que es el que define la separación entre Agro y No Agro (Figura 14). El análisis utilizando la matriz de distancias de Bray Curtis indicó que las variables que mejor correlacionaron con el patrón de comunidades fueron los niveles de materia orgánica, de arcilla, de nitratos el pH y la conductividad eléctrica (Mantel r= 0,6214, p≤ 0,05). En un grafico de PCoA del tipo biplot se observó que la materia orgánica y el nivel de nitratos correlacionaron con el primer eje del ordenamiento, que es el que define la separación entre Agro y No Agro (Figura 14). El grafico de ordenamiento se calculo utilizando los datos promedios de abundancia de OTUs y de distancias Unifrac. Este es además el motivo por el cual la variación explicada por los ejes difiere con la presentada en la figura 13. No se encontraron correlaciones significativas entre el patrón descripto por la distancia unweighted Unifrac y las características de suelo evaluadas.

***Tabla 2*: Características físico- químicas de los suelos muestreados**

Sitio	*La Estrella* Agro	*La Estrella* No agro	*La Negrita* Agro	*La Negrita* No agro	*C. Klein* Agro	*C. Klein* No Agro
pH	6,06	5,4	5,6	6,21	5,38	5,9
Mat Org (%)	2,6	6,2	2,7	5,8	2,9	3,6
N org (%)	0,19	0,35	0,18	0,31	0,21	0,23
NO_3^{-2} (ppm)	40,3	62,8	43	62,2	39,3	52,3
Pi (ppm)	8,26	92,26	11,58	81,72	12,25	31,82
CE ($dS\ m^{-1}$)	0,27	0,29	0,17	0,17	0,16	0,23
Limo (%)	49	51	51	49	42	46
Arcilla (%)	22,28	19,28	23,28	24,28	20,28	14,28
Arena (%)	28,72	29,72	25,72	26,72	37,72	39,72
Textura	franco	franco	franco limoso	franco limoso	limoso	limoso

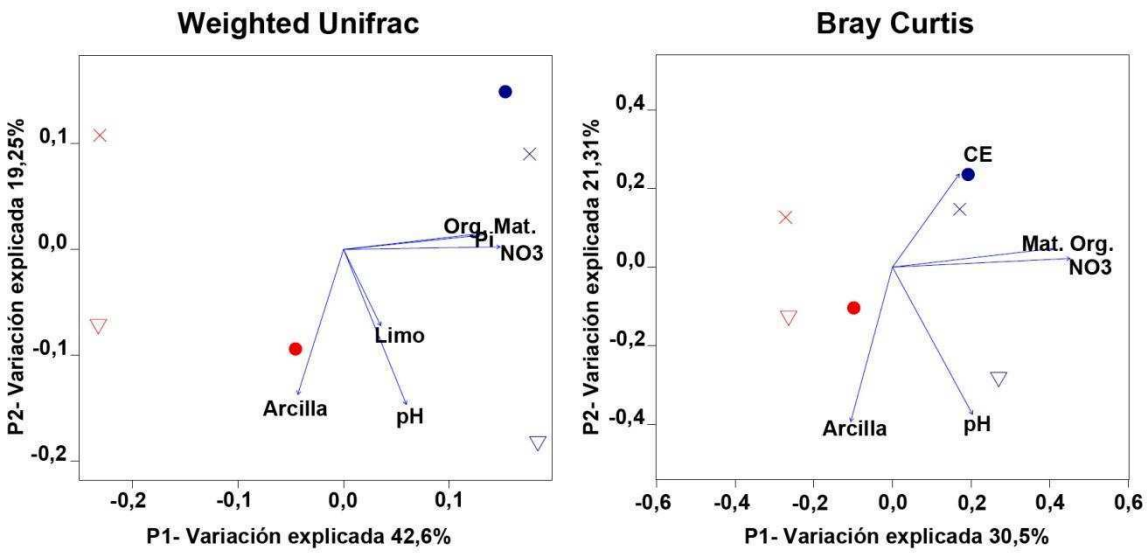


***Figura 14*: Correlación de variables físico-químicas del suelo con el patrón de diversidad beta de las comunidades de suelos Agro (Rojo) y No Agro (Azul) en la Pampa Ondulada. Los puntos corresponden a muestras tomadas en *La Estrella*, los triángulos a muestras de *La Negrita* y las cruces muestras de *Criadero Klein*.**

Diferencias en la composición taxonómica de las comunidades de suelos con y sin historia de manejo agrícola

Se analizó la composición taxonómica de las comunidades microbianas de suelos Agro y No agro clasificando las secuencias representantes de cada OTU. Se encontraron diferencias incluso a nivel de phylum entre tratamientos (Figura 15). La abundancia de *Verrucomicrobia, Planctomycetes, Actinobacteria* y *Chloroflexi* fue mayor en las comunidades de suelos No agro ($p \leq 0,05$). Por otro lado los phyla *Gemmatimonadetes*, WS3 y *Nitrospirae* se vieron enriquecidos en comunidades de suelos Agro ($p \leq 0,05$). No se vieron diferencias significativas en las abundancias de los phyla *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Bacteroidetes*. Los 10 taxa mencionados abarcan, en promedio, un 95% de cada comunidad analizada.

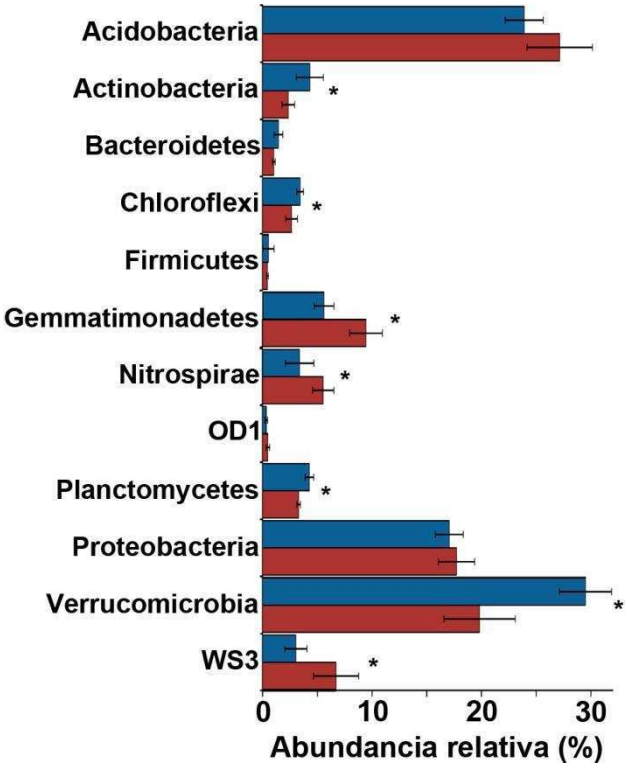


***Figura 15*: Promedio de las abundancias relativas de los phyla más abundantes en las comunidades de suelos Agro (Rojo) y No Agro (Azul). Las barras indican ± 1 desvío estándar, (*) indica diferencias significativas: p≤0,05**

Discusión

El patrón de diversidad beta observado da cuenta del efecto del uso de la tierra sobre las comunidades estudiadas. La estructura de las comunidades de suelos con historia de manejo agrícola se distingue claramente de la estructura de las comunidades de suelos sin historia. Las diferencias se observaron tanto a nivel cualitativo (i.e. presencia y ausencia de OTUs) como a nivel cuantitativo (i.e. abundancias de OTUs). Sin embargo, la mayoría de la variación se observó a nivel cuantitativo. Esto quiere decir que la diferencia en las estructuras está dada mayoritariamente por el cambio en las abundancias de OTUs. Es importante destacar que la mayor variación cuantitativa entre tratamientos se observó al analizar distancias filogenéticas (i.e. weighted Unifrac), que dan cuenta del cambio evolutivo sufrido por las comunidades microbianas. Estos resultados son concordantes con la antigua hipótesis de Baas-Becking que postula que los factores ambientales locales son mayormente responsables de la variación observada en los patrones de diversidad microbianos [77, 159]. La hipótesis establece "Todo está en todos lados, pero el ambiente selecciona". Ya en 1934 Baas-Becking sostenía que la mayoría de la diversidad microbiana esta oculta para nuestra observación porque tiene una densidad que no alcanza el límite de detección, pero que todos los microorganismos se encuentran distribuidos universalmente. Se supone una presión de las variables locales, en este caso las propiedades fisico- químicas del suelo, sobre la abundancia (densidad) de los microorganismos. A principios del siglo XX la detección de microorganismos estaba limitada a lo que las técnicas de cultivo y aislamiento permitían. Hoy las técnicas de secuenciación masiva nos permiten, como en nuestro caso, acceder a los organismos menos abundantes, o especies raras [160, 161]. Incluso con este aumento en el poder de detección pareciera cumplirse la hipótesis de Baas-Becking para el caso de las comunidades de los suelos de la Pampa Ondulada. La variación de OTUs es mínima a nivel cualitativo, pero es grande y significativa a nivel de abundancias; los mismos taxa son compartidos en suelos con y sin historia de manejo, sin embargo, la abundancia difiere significativamente, "el ambiente está seleccionando". Acompañando esta línea de pensamiento, no se observaron correlaciones entre la variación cualitativa de la diversidad beta y las variables del suelo. Si se observaron en cambio correlaciones entre las distancias cuantitativas entre muestras y la variación en las propiedades del suelo. Los cambios en el nivel de materia orgánica, de nitratos, de fósforo, en el pH, en la conductividad eléctrica y en la textura del suelo están relacionados con las abundancias de OTUs. De estas propiedades, la materia orgánica y los nitratos son los que determinan la variación entre comunidades Agro y No agro para ambas métricas

de abundancia utilizadas (i.e. weighted Unifrac y Bray Curtis). Esto puede evidenciarse en la dirección de los vectores en los gráficos de la figura 14. En palabras de Baas-Becking: la materia orgánica y los nitratos serian los factores ambientales locales que están "seleccionando" la proliferación de uno u otro taxón en comunidades con y sin historia de manejo. Las otras variables que correlacionan con la variación de la estructura de las comunidades (i.e. pH, EC, arcilla y limo) parecen estar más relacionadas con cambios ambientales locales y no con la ausencia o presencia de manejo agrícola. Esto se evidencia por la dirección de los vectores en los ordenamientos de la figura 14. Los niveles de fósforo fueron detectados como importantes al tener en cuenta las distancias filogenéticas entre comunidades. Los cambios en el nivel de fosforo podrían estar seleccionando linajes que no pueden distinguirse como OTUs diferenciales al 97% de similitud y por eso esta tendencia no se detecta al utilizar Bray Curtis como medida de diversidad beta.

El análisis de la composición taxonómica también reveló diferencias entre comunidades de suelos Agro y No Agro. Estas diferencias se vieron, concordantemente con los resultados de diversidad beta, en las abundancias relativas de los taxa. La abundancia de representantes de los phyla *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae* y WS3 fue mayor en los suelos con historia de manejo. En cambio, *Verrucomicrobia, Plactomycetes*, *Actinobacteria* y *Chloroflexi* fueron más abundantes en suelos No Agro. Estos resultados remiten, al menos en parte, a la hipótesis de selección trófica que divide a los microorganismos entre oligotróficos y copiotróficos según la disponibilidad de nutrientes a la que están expuestos [162]. Muchos suelos han sido previamente clasificados como ambientes oligotróficos [163]. Esto se debe a que, a pesar de que los niveles de materia orgánica y de nutrientes son altos, se encuentran en formas recalcitrantes. La mayoría de la materia orgánica se encuentra en formas moleculares difíciles de acceder y de descomponer por parte de los microorganismos. Este es el caso de los suelos de la Pampa Ondulada, que son ricos en sustancias húmicas [134]. Los microorganismos adaptados a ambientes oligotróficos suelen ser estrategas-K, de crecimiento lento, con sistemas de captación de nutrientes muy eficientes y con altas constantes de afinidad por sustrato. Por otro lado los organismos copiotróficos suelen ser estrategas-r, con altas tasas de crecimiento frente a alta disponibilidad de nutrientes y grandes requerimientos nutricionales. Los suelos bajo manejo agrícola pueden clasificarse como copiotróficos frente a los suelos de los parques, debido a la presencia de fertilización nitrogenada y de residuos orgánicos luego de cada cosecha. Se ha demostrado previamente que la fertilización y la presencia de residuos ha aumentado los niveles de materia orgánica

lábil en suelos de la Región Pampeana [164]. Nuestros resultados concuerdan con estas hipótesis ya que los suelos No Agro poseen mayor abundancia de representantes de los phyla *Verrucomicrobia y Planctomycetes.* Representantes del phylum *Verrucomicrobia* han sido previamente descriptos como oligrotróficos [165, 166]. Además, ya se ha documentado la disminución de este phylum en experimentos de fertilización nitrogenada [167]. Un análisis de genomas de representantes del phylum *Planctomycetes* los ha caracterizado como oligotróficos [168] y solo han sido aislados en medios con bajos nutrientes [169].

Otra característica de los suelos con presencia de manejo agrícola es la de ser ambientes más heterogéneos que los suelos de los parques. La presencia de fertilización, la rotación de cultivos, los períodos de barbecho, la cobertura de residuos, la aplicación de agroquímicos son presiones que no existen en los suelos sin historia de manejo y que generan cambios en la disponibilidad de nutrientes y recursos para los microorganismos. Los taxa que son mayoritarios en las comunidades de suelos agrícolas parecen estar más adaptados a ambientes heterogéneos, como es el caso de *Gemmatimonadetes.* Un análisis de la distribución geográfica de los representantes del phylum ha evidenciado su posible rol generalista al revelar su presencia en múltiples tipos de suelo con distintos niveles de nutrientes [170]. Además, el aumento en la abundancia de *Gemmatimonadetes* ya ha sido relacionado con la presencia de fertilización nitrogenada en suelos de bosques de tundra [171]. Los mismos autores no encontraron presencia de *Verrucomicrobia* en suelos nitrogenados, pero si en el suelo control. Resultado que es congruente con nuestros datos. Por otro lado, y también en concordancia con nuestros resultados, otros autores también han observado mayor cantidad de representantes de este phylum en suelos con manejo agrícola que en suelos control [172]. Son pocas las especies de *Gemmatimonadetes* que se han logrado aislar y caracterizar hasta el momento [173, 174], por lo tanto la información sobre su ecología y fisiología son escasas. Sin embargo, la evidencia parece indicar que son organismos bien adaptados a la heterogeneidad ambiental. Hipotetizamos que el aumento de *Gemmatimonadetes* en suelos Agro esta dado por la ventaja que da esta plasticidad.

Hemos observado también una mayor abundancia del phylum *Nitrospirae* en suelos con historia agrícola La filogenia de este grupo taxonómico explicaría su adaptación a ambientes heterogéneos en cuanto a la disponibilidad de nitrógeno. Inicialmente se había propuesto que el equilibrio entre las abundancias de representantes del género *Nitrobacter* y del phylum *Nitrospirae* regulaba los niveles de oxidación de nitritos en suelos agronómicos [175]. Las bacterias del grupo *Nitrobacter* suelen ser clasificadas

como estrategas-r, con alta tasa de crecimiento y actividad específica pero baja afinidad por nitrito, en comparación con representantes de *Nitrospirae* que se han definido como estrategas-K y su afinidad es mayor [176]. De esta forma el equilibrio entre las abundancias y actividades de ambos grupos permitiría un mejor aprovechamiento del nitrito presente en los suelos; los grupos "r" estarían explotando el recurso en zonas de alta concentración y disponibilidad; y los "K" en zonas donde es más escaso. Esta hipótesis, sin embargo, parece no ser aplicable a nuestros suelos en estudio ya que no hemos detectado OTUs clasificados dentro del género *Nitrobacter.* La oxidación de nitrito parece estar a cargo de otros taxa. Más recientemente se ha propuesto que la diversidad de sublinajes de *Nitrospirae* ocupa diferentes posiciones en una escala imaginaria que va de estrategas-K a estrategas-r; y que los niveles de nitritos definen la abundancia y distribución espacial de estas poblaciones en barros activados [177]. Nosotros proponemos un escenario similar para los suelos de la Pampa Ondulada: existe un gradiente de concentración y disponibilidad nitrito determinada por la propia heterogeneidad en la estructura del suelo y esta diferenciación es más marcada en suelos agronómicos a causa de los cambios en la estructura debidos al uso del suelo, pero también y sobre todo, por la fertilización nitrogenada [178]. Este gradiente determinaría nichos diferentes a ser explotados por distintos sublinajes de *Nitrospirae*. Hipotetizamos que se genera una competencia por colonización de estos nichos y que la mayor abundancia de *Nitrospirae* puede estar reflejando una mayor diversidad de sublinajes en suelos con historia de manejo. En otras palabras, una mayor abundancia y diversidad de *Nistrospirae* estaría dando ventajas adaptativas a la comunidad en suelos con fertilización y marcados gradientes de disponibilidad de nitritos.

En resumen, hemos demostrado que las comunidades microbianas de suelos con historia de manejo son estructuralmente diferentes a las comunidades de suelos sin manejo de la Pampa Ondulada; y hemos visto que la variación en el patrón de comunidades está asociada a los cambios en las abundancias de OTUs. Este cambio coincide con la hipótesis de Baas-Becking que dice "todo está en todos lados pero el ambiente selecciona". Pudimos comprobar la correlación de los cambios con la variación en los factores ambientales. Vimos que la presión generada por el uso agrícola estaría "seleccionando" comunidades distintas a las presentes en suelos sin manejo. El análisis de la composición taxonómica nos permitió hipotetizar que los cambios producidos por la presión de la agricultura influyen en las estrategias tróficas de las poblaciones de microorganismos. Seleccionándose estrategias-r o copiotróficas cuando los nutrientes están mayormente disponibles, por efecto de la fertilización y

presencia de residuos, y eligiendo un estilo de vida "K" frente a una disponibilidad baja de nutrientes.

CAPÍTULO I -Parte B

Impacto de la agricultura sobre los perfiles metagenómicos de las comunidades microbianas del suelo.

El caso de la Pampa Ondulada.

Como **objetivo** de esta sección se buscará comparar los perfiles metabólicos de las comunidades microbianas de suelos con y sin historia de uso agrícola en el Pampa Ondulada.

Se **hipotetiza** que los cambios en las características del suelo generados por el uso agrícola han impactado en la evolución y adaptación de las comunidades microbianas y este efecto se verá reflejado en los perfiles metagenómicos de las comunidades.

Como premisa se cuenta con los resultados obtenidos en el Capítulo I- Parte A, donde se observó que la estructura y composición difieren entre comunidades de suelos con y sin historia de manejo agrícola.

Materiales y Métodos

Sitios, muestreo, propiedades de suelo y extracción de ADN

Para responder a los objetivos planteados en esta sección se utilizaron las mismas muestras de suelo que para los análisis del Captilo I- Parte A. Para más detalles ver la sección "Materiales y Métodos" de dicho capítulo.

Preparación de bibliotecas para "shotgun sequencing"

Para la preparación de bibliotecas se utilizaron 500 ng de de ADN por lote o parque muestreado provenientes de una única muestra de suelo. Se siguieron los protocolos detallados en el manual Rapid Library Preparation Method de Roche-454 (http://454.com/my454/). Las bibliotecas se prepararon adicionando un identificador único (MID o barcode) por ligación para cada muestra y fueron pooleadas en una solución conteniendo la misma cantidad de masa de cada una. Los pooles se armaron según el establecimiento donde fueron tomadas las muestras de suelo inicialmente. Las soluciones finales fueron cuantificadas utilizando espectrometría de fluorescencia para la detección de fluoróforo FAM, presente en los adaptadores de secuenciación 454, y diluidas a una concentración de $1x10^7$ moléculas de ADN/ul para generar la solución de trabajo a secuenciar.

Secuenciación de bibliotecas

Las soluciones de trabajo fueron tituladas previo a la secuenciación. Para ello se realizaron amplificaciones por PCR en emulsión utilizando los procedimientos y reactivos especificados en el manual emPCR Amplification Manual -Lib-L- SV (http://454.com/my454/). La preparación de las muestras para secuenciación fue realizada utilizando la cantidad de copias de ADN determinada en la titulación siguiendo los procedimientos detallados por los manuales emPCR Amplification Manual - Lib-L LV (http://454.com/my454/). La secuenciación de las bibliotecas fue realizada de acuerdo a lo establecido por el manual Sequencing Method Manual en un secuenciador Titanium series de Roche-454. Cada biblioteca pooleada fue secuenciada en 1 pico-placa, en total se realizaron 3 corridas de secuenciación, una por cada establecimiento muestreado. Cada biblioteca a secuenciar contenía un pool

de dos bibliotecas generadas con muestra de ADN provenientes de muestras de suelo de cada lote y parque de cada establecimiento.

Procesamiento y análisis de secuencias obtenidas

Los archivos SFF obtenidos de las corridas de secuenciación fueron importados al servidor "en línea" MG-RAST [179] para análisis y filtrado por calidad y posterior anotación. El filtrado de secuencias incluyó en un primer paso la eliminación de secuencias con ± un desvío estándar de la media de longitud. El siguiente paso consistió en la eliminación de duplicados técnicos. Se obtuvo un promedio de 1,28 $x10^6$ secuencias por muestra.

Las secuencias filtradas fueron luego asignadas por similitud a clusters de ortólogos (COG) utilizando un E-value de $1x10^{-20}$, un alineamiento promedio de 80 aminoácidos de longitud y un 70% mínimo de identidad.

Se calcularon las abundancias relativas dividiendo el número de hits para cada COG o categoría por el total de las secuencias para casa muestra. Sobre las tablas de abundancias relativas de categorías metabólicas se calcularon distancias euclidianas entre pares de muestras. Las matrices obtenidas se utilizaron para el cálculo de Coordenadas Principales (PCoA). Para evaluar la significancia de los grupos observados en el ordenamiento se utilizaron las pruebas no paramétricas ANOSIM [180] y PERMANOVA [181], con 999 permutaciones. Se utilizó la prueba de Mantel para evaluar la correlación de las matrices de perfiles metabólicos con las matrices de diversidad beta utilizadas en el Capítulo I- Parte A. Se utilizó el test BIOENV (Clarke and Ainsworth 1993) para determinar que variables físico-químicas del suelo correlacionaron mejor con el patrón de perfiles metabólicos. La tabla con las variables físico-químicas fue centrada y estandarizada utilizando "Z- scores". Se utilizó el test de Mantel para evaluar la significancia de las correlaciones encontradas.

Para comparar las abundancias de clusters de ortologos o sus categorías entre suelos con y sin historia de manejo se utilizó el promedio de abundancias relativas para cada tratamiento. Para evaluar las significancias se utilizó la prueba de Student de una cola. Todos los cálculos numéricos fueron realizados con los paquetes "stats", "vegan" y "BiodiversityR" del entorno R [182].

Resultados

La visualización del patrón de perfiles metagenómicos basado en distancias euclidianas mostró cierta separación entre suelos bajo distinto tratamiento (Figura 16). Los dos primeros ejes del PCoA explicaron más del 60% de variación entre muestras. Las elipses de desvío estándar muestran un solapamiento entre ambos tratamientos, indicando que algunas características son compartidas entre comunidades de suelos con y sin historia de uso agrícola. Las pruebas de ANOSIM y PERMANOVA arrojaron resultados no significativos ($p \geq 0,05$). Estos resultados indican que la presencia de agricultura no fue factor suficiente para separar los perfiles metabólicos, sugiriendo que otros factores están actuando sobre la variación en los mismos. Sin embargo, se confirmó una correlación positiva entre la matriz de distancias euclidianas basada en categorías de COG y la matriz de diversidad beta basada en weighted Unifrac (Mantel r: 0,5036 $p \leq 0,05$). Estos resultados indican que los perfiles metabólicos difieren entre tratamientos, sin embargo la evidencia no es tan fuerte como el caso del análisis de diversidad beta (ver figura 13). Esto puede deberse, probablemente, a la falta de sub-muestras para eliminar el ruido debido a la variación por establecimiento en el análisis.

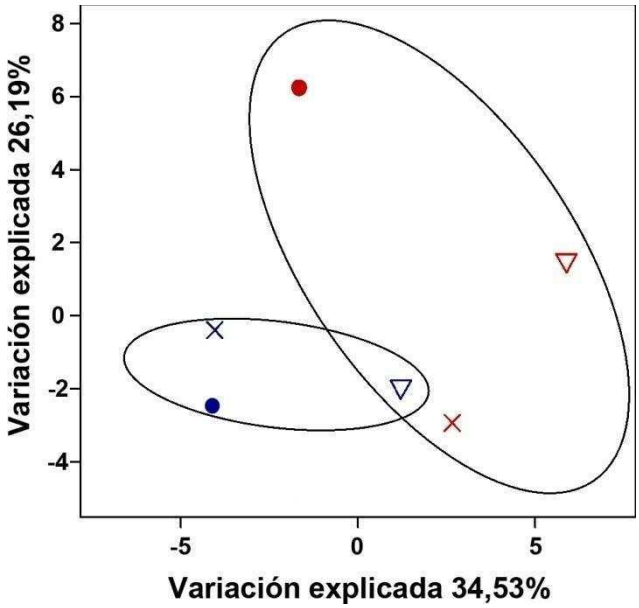


***Figura 16*: Patrón obtenido a partir de los perfiles metabólicos de las comunidades de suelos Agro (Rojo) y No Agro (Azul) en la Pampa Ondulada. Los puntos corresponden a muestras tomadas en *La Estrella*, los triángulos a muestras de *La Negrita* y las cruces muestras de *Criadero Klein*. Las elipses determinan el desvío estándar con un límite de confianza de 95%.**

Al analizar cuales variables de suelo (Tabla 2) correlacionaron mejor con los perfiles metabólicos se detectó a los niveles de arcilla y de limo como los mejores candidatos, con un coeficiente de correlación de 0,35. Sin embargo no se pudo probar la significancia de esta correlación ($p>0,05$).

Un análisis basado en la comparación de categorías metabólicas entre suelos Agro y No Agro mostró diferencias significativas. Las categorías metabólicas asociadas a transcripción, modificación de proteínas, transporte y metabolismo de nucleótidos, biogénesis de membrana y pared celular y secreción y tráfico intracelular fueron más abundantes en comunidades de suelos con historia de manejo agrícola (Figura 17, $p\leq0,05$)

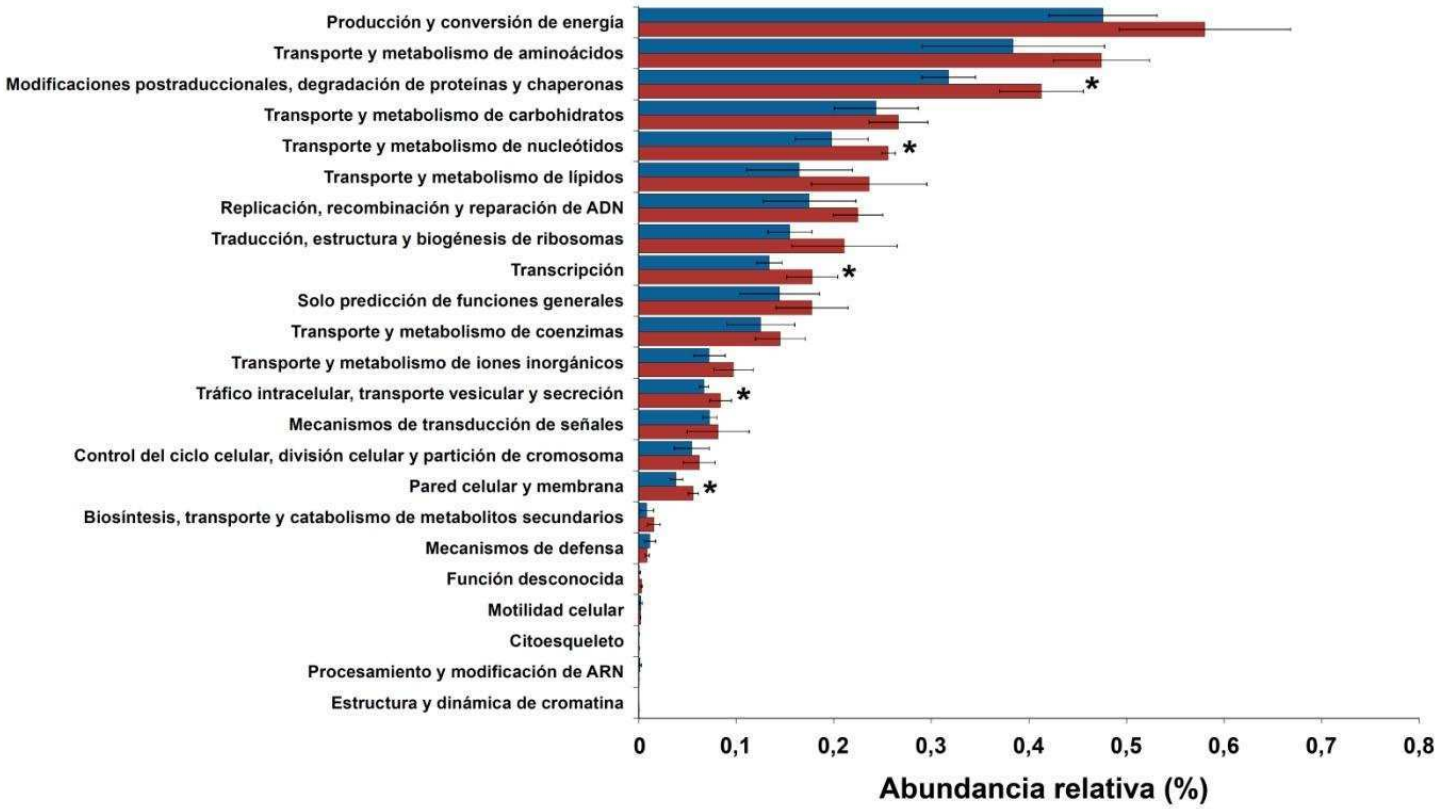


Figura 17: **Promedio de las abundancias relativas de asignaciones (hits) respecto del total de secuencias por muestra para cada categoría de COGs. Rojo corresponde a suelos Agro y azul a suelos No Agro. Las barras indican ± 1 desvío estándar, (*) indica diferencias significativas, $p\leq0,05$**

La comparación dentro de las categorías reveló también diferencias entre comunidades Agro y No Agro (Figura 18, $p\leq0,05$). Se detectó que las abundancias de

COGs asociados a enzimas y motivos relacionados con el metabolismo energético fueron diferentes entre los suelos de los lotes y de los parques. Clusters relacionados con el metabolismo de acetil-CoA y Coenzima A y con el almacenamiento de energía o estados de quiescencia fueron más abundantes en suelos No Agro. Este es el caso de los COGs de pantotenato quinasa, fosfotransacetilasa y de utilización de trehalosa. Por otro lado, los COGs asignados a mecanismos de regulación rápida, a enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y a la asimilación de nitrógeno fueron más abundantes en suelos Agro.

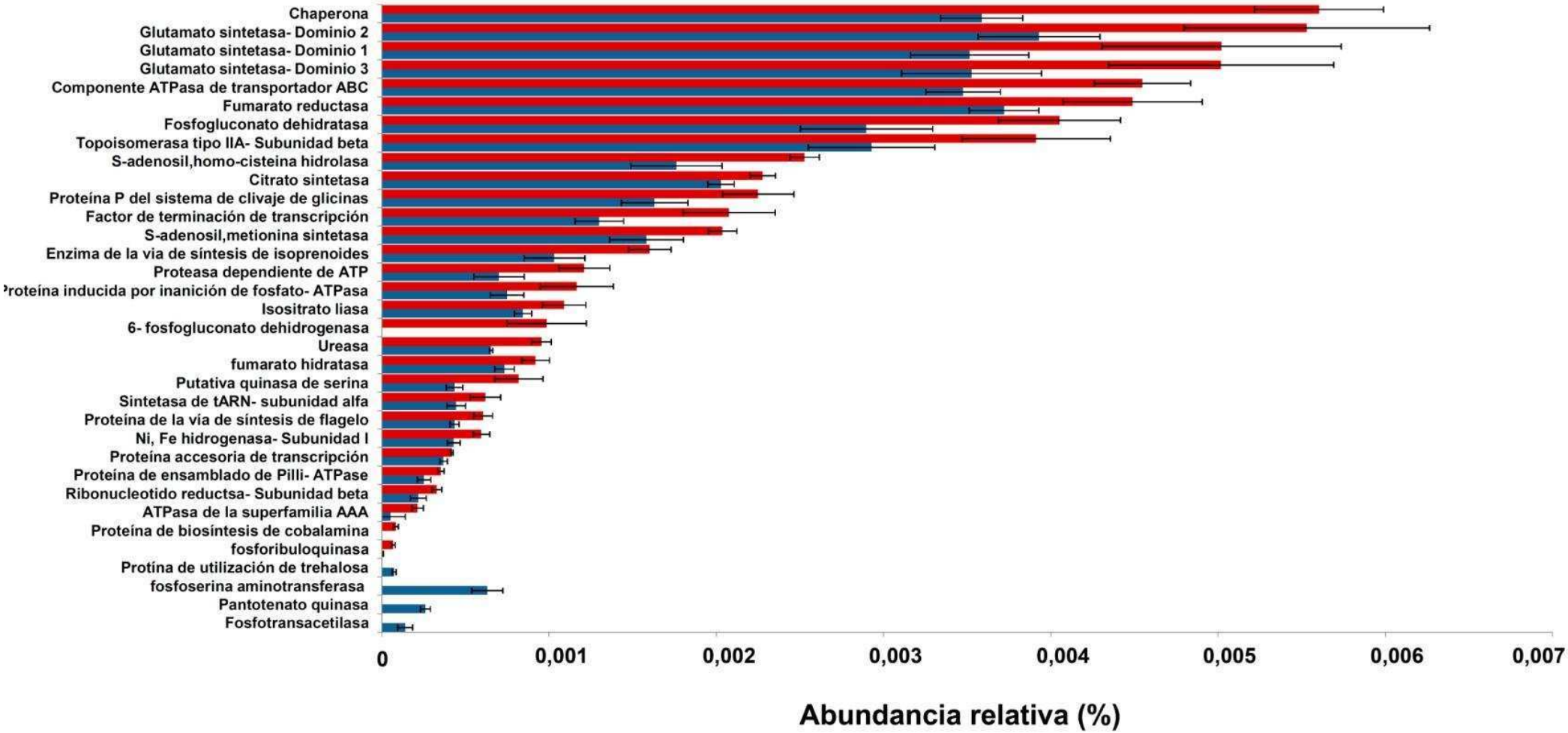


Figura 18: **Promedio de las abundancias relativas de asignaciones (hits) respecto del total de secuencias por muestra para cada COG. Rojo corresponde a suelos Agro y azul a suelos No Agro. Las barras indican ± 1 desvío estándar. Se muestran solo los COGs significativos, p≤0,05**

Discusión

El análisis de los perfiles metabólicos permitió evidenciar diferencias entre los suelos con y sin historia de manejo. A nivel del perfil completo las diferencias fueron débiles, sin embargo a nivel puntual pudieron evidenciarse diferencias entre las capacidades metabólicas presentes en los microbiomas de suelos Agro y No Agro. La falta de significancia en el resultado de la prueba de ANOSIM hace pensar en la presencia de otros factores además del uso agrícola en la estructuración de los perfiles metabólicos. Sin embargo, al buscar correlaciones con variables físico-químicas del suelo tampoco se encontraron correlaciones significativas con el patrón observado. Este resultado no indica que no existan variables ambientales influyendo en el patrón metabólico de las comunidades, sino que no se pudieron explicar con las variables estudiadas, o al menos no pudieron ser reveladas con la cantidad de datos utilizados. De todos modos, sí se observó una correlación fuerte entre el patrón de diversidad beta y el de perfiles metabólicos. Esto indica cierto grado de correspondencia entre los cambios observados en la diversidad de las comunidades y en sus metagenomas por el impacto agrícola. Sugiriendo que cambios en la composición taxonómica no implican redundancia funcional. En un trabajo reciente, Fierer et al. también observaron correlaciones entre la diversidad funcional revelada por datos metagenómicos y la diversidad taxonómica en comunidades de suelos de praderas en Estados Unidos [183]. Estos resultados resaltan la importancia de la diversidad de taxa en las comunidades del suelo.

Además, fue posible evidenciar diferencias puntuales entre las características metabólicas de los metagenomas de suelos Agro y No Agro. Se observó una mayor abundancia de secuencias asignadas a transcripción, modificación y transporte de proteínas, transporte y metabolismo de nucleótidos y biogénesis de pared celular y membrana en los microbiomas de suelos agrícolas. Aumentos en estas categorías metabólicas han sido previamente reportados para comunidades de suelos con fertilización nitrogenada respecto de suelos sin fertilización [41]. En concordancia, algunos de los COGs aumentados en suelos agrícolas se vieron anteriormente sobre representados en genomas de microorganismos copiotróficos; mientras que las características metabólicas más abundantes en suelos de los parques se vieron más representadas en genomas de microorganismos oligrotoficos de ambientes marinos [168].

Entre los COGs más abundantes de las comunidades Agro encontramos genes relacionados con mecanismos de regulación por riboswitches, como ser S- adenosil,

metionina sintetasa, S-adenosil, homocisteína hidrolasa y proteína de biosíntesis de cobalamina [184-186]. Como ya se mencionó en el Capítulo I- parte A, proponemos a los suelos con historia de uso agrícola como ambientes copiotróficos y heterogéneos, respecto de los suelos de los parques, y vimos que la composición de las comunidades microbianas de los mismos indica una tendencia hacia la adaptación a este tipo de ambientes. La mayor presencia de COGs relacionados con riboswitches podría indicar también una ventaja frente a la heterogeneidad ambiental y mayor disponibilidad de nutrientes. Estos mecanismos antiguos, basados en aptámeros de ARN, no precisan de moléculas intermediarias y por lo tanto son de reacción rápida [187], una característica muy deseable en organismos adaptados a cambios en los niveles de nutrientes [188]. Conforme con esta hipótesis, previamente se ha propuesto que la adquisición del gen de S-adenosil, homocisteína hidrolasa por parte de algunas bacterias, ha permitido su evolución hacia una mayor versatilidad metabólica y un aumento en el tamaño del genoma [189], características conocidas de copiotrofía [168]. En concordancia, previamente se ha demostrado una disminución del uso del aminoácido metionina por parte de microorganismos en ambientes oligotróficos [190] y una dependencia de los procesos dependientes de metionina y de S-adenosilmetionina (SAM), como ser la metilación y la síntesis de metabolitos secundarios como la cobalamina (vitamina B12), con la disponibilidad de nutrientes [191]. Los COGs diferenciales entre suelos Agro y No Agro, relacionados con riboswitches, corresponden a enzimas involucradas en estos procesos. Sumando a estas evidencias, se han observado cambios en la estructura de comunidades microbianas en relación con los niveles de vitaminas B en ambientes marinos [192]. Faltan aún evidencias para unir el nivel de disponibilidad de nutrientes en los suelos agronómicos con los procesos relacionados con el metabolismo de metionina y vitaminas B, y su regulación por riboswithces, sin embargo la mayor abundancia de los COGs mencionados respecto de los suelos No Agro, sugiere una ventaja adaptativa para la vida en un ambiente más copiotrófico y heterogéneo.

Además, las diferencias en los perfiles metabólicos permiten pensar en una mayor adaptación a cambios en los niveles de nitrógeno por parte de las comunidades de suelos con historia de uso agrícola. Tres COGs asignados a la enzima glutamato sintetasa (GOGAT) fueron más abundantes en microbiomas de suelos Agro. GOGAT es la enzima encargada de la síntesis de glutamato mediante el uso de 2-ketoglutarato o glutamina como sustrato. El rol combinado de GOGAT con la enzima glutamina sintetasa permite a las células bacterianas censar los niveles externos de NH_4^+ [193]. Mediante la asimilación de NH_4^+ usando 2-ketoglutarato (derivado de TAC), el circuito

sintetiza glutamina y glutamato. Estos dos intermediarios proveen N para la síntesis de todos los componentes nitrogenados [194]. Ya ha sido demostrado que los niveles de glutamina sirven como sensor de la disponibilidad externa de N y puede ser responsable de la modulación de las tasas de crecimiento [195]. Frente a esto, la mayor abundancia de GOGAT en suelos Agro sugiere su importancia en la detección de flujos de nitrógeno provocados por la fertilización. En concordancia, se detectó mayor abundancia de COGs relacionados con enzimas del TCA, como ser citrato sintasa y succinato deshidrogenasa, en los perfiles de suelos Agro. La relación entre la vía de asimilación de nitrógeno regulada por GOGAT y el TCA ha sido previamente descripta por Doucette y colaboradores [196]. Estos autores demostraron que la concentración de los componentes de la vía de GOGAT y de sus intermediarios metabólicos, como ser el nivel de aminoácidos y de intermediarios del TCA, cambian rápido y considerablemente con el aumento de la disponibilidad de nitrógeno, sin embargo, la concentración de intermediarios de la glucólisis se mantiene constante. Además confirmaron el rol dominante de la concentración de 2-ketoglutarato en el control del metabolismo central en enterobacterias. Frente a estos antecedentes, proponemos que el aumento en las abundancias de COGs de la vía de GOGAT y TCA en suelos Agro está relacionado con la adaptación de las comunidades microbianas a los cambios en los niveles de nitrógeno por fertilización. También observamos un aumento en la abundancia de ureasa en los suelos Agro. Estos suelos han sido históricamente fertilizados con dos tipos de fertilización: basada en amonio y basada en urea. Hipotetizamos que la presión que ejercieron ambos tipos de fertilizaciones seleccionó una comunidad mejor adaptada a los cambios en los niveles de distintos tipos de fuentes de nitrógeno y esto es lo que observamos en la composición de los metagenomas.

Es muy importante aclarar que nuestros resultados no revelan si hubo cambios en la expresión o la actividad de los metabolismos mencionados, sin embargo los aumentos en las abundancias de COGs pueden estar reflejando mayor diversificación y especialización de estos metabolismos. La presencia de un mayor número de copias de genes estratégicos en genomas y metagenomas ya ha sido relacionada con estilos de vida oligotróficos o copiotróficos [41, 168].

Por otra parte, los metagenomas de suelos sin historia agrícola presentaron aumentados niveles de COGs relacionados con el metabolismo de Coenzima A y acetil-CoA. El acetil-CoA es un metabolito central y está involucrado en numerosas transformaciones metabólicas. Es una molécula de acetato unida a Coenzima A; es, en esencia, una forma activada de dos carbonos que la célula utiliza para unir

metabolitos como ser acidos grasos y esteroles. Alternativamente, el acetil-CoA puede ser oxidado via TCA para producir NADH o servir como dador de metabolitos para acetilación y modificación de proteínas [197]. Es comprobado que altos niveles de acetil-CoA indican un estado celular proliferativo o "alimentado", mientras que niveles bajos indican un estado quiescente o de "hambreado". La enzima pantotenanto quinasa (PanK), uno de los COGs mayoritarios en suelos No Agro, es clave en la síntesis de coenzima A [198]. Se ha demostrado que PanK es esencial para el mantenimiento de los niveles intracelulares de coenzima A y que es el factor clave para el paso del estado "alimentado" al estado "hambreado" en células eucariotas [199]. Mutantes deficientes en PanK presentaron niveles bajos de coenzima A generando así niveles atenuados de oxidación de ácidos grasos. Por otro, lado se ha propuesto que los microorganismos oligotróficos utilizan preferentemente lípidos como intermediarios y como almacenamiento de carbono y energía [168]. Estas conclusiones derivan de la alta detección de familias de genes asociados a la degradación de ácidos grasos en genomas de bacterias de ambientes marinos oligotróficos. Proponemos que los altos niveles de PanK en los metagenomas de suelos No Agro están relacionados con el mantenimiento correcto de los niveles de acetil-CoA y coenzima A, y una correcta regulación metabólica y por ende una utilización adecuada de ácidos grasos para producir energía, confiriendo una ventaja frente la oligotrofía del ambiente. En concordancia vimos mayor abundancia de secuencias asignadas al COG de fosfotransacetilasa en estos microbiomas. Es sabido que frente a condiciones de limitación de energía ciertos micoorganismos pueden convertir acetil- CoA a acetil-fosfato y luego a acetato mediante la actividad de fosfotransacetilasa y acetato kinasa. El acetato es liberado y luego recapturado en momentos de baja disponibilidad de nutrientes [200]. Al igual que para PanK, creemos que una mayor presencia de fosfotransacetilasa en estos suelos está relacionada con una adaptación a la baja disponibilidad de materia orgánica y nutrientes. El tercer COG más abundante en suelos sin historia de manejo agrícola fue el de la proteína de utilización de trehalosa. Varios microorganismos utilizan trehalosa como fuente de carbono, almacenamiento de carbohidratos o como osmoprotector [201, 202]. Varios miembros del género *Mycobacteria* y de la familia *Frankiaceae*, del phylum *Actinobacteria*, pueden producir y/o utilizar trehalosa [203-205]. Como ya se había mencionado en el Capítulo I- Parte A, se observó mayor abundancia de *Actinobacteria* en los suelos No Agro. Más aún, secuencias clasificadas dentro de la familia *Frankiaceae* solo fueron detectadas en estos suelos (Figura A1- Anexo) y el nivel de representantes del género *Mycobacteria* fue mayor que en suelos agrícolas (Figura A2- Anexo).

Resumiendo, en este capítulo pudimos ver que existen diferencias a nivel puntual entre las propiedades metabólicas de los metagenomas de suelos con y sin historia de uso agrícola. Observamos que los metabolismos que están más representados en una u otra condición sugieren adaptaciones a las diferencias en los niveles de nutrientes y de homogeneidad del ambiente. Los metagenomas de suelos bajo manejo agrícola y condiciones heterogéneas presentaron mayor cantidad de COGs relacionados con utilización de nitrógeno, metabolismo central de carbono y de regulación rápida y versátil. Mientras que los metagenomas de suelos sin historia de manejo parecen más adaptados a ambientes de equilibrio oligotrófico, ya que presentaron mayor abundancia de enzimas relacionadas con regulación de estados de hambreado y de almacenamiento de carbono y energía. Finalmente vimos que las diferencias a nivel global de los perfiles metabólicos correlacionan con el patrón de diversidad de las comunidades.

CAPITULO II

Impacto de la siembra directa y la labranza convencional sobre la estructura, composición y perfiles metabólicos de las comunidades microbianas del suelo.

El experimento de Balcarce.

El **objetivo** de este capítulo será establecer las diferencias del impacto generado por distintos sistemas de labranza en la estructura de la diversidad, en la composición taxonómica y en los perfiles metabólicos de las comunidades microbianas de suelos de la Región Pampeana.

Frente a la premisa de que la labranza convencional y la siembra directa producen distintos efectos sobre la estructura y las características químicas y físicas del suelo, se **hipotetiza** que su impacto sobre las comunidades microbianas será diferente. Predecimos que estas diferencias se evidenciarán en el patrón de diversidad beta, en la composición taxonómica y en los perfiles metabólicos.

Materiales y Métodos

Sitio y muestreo

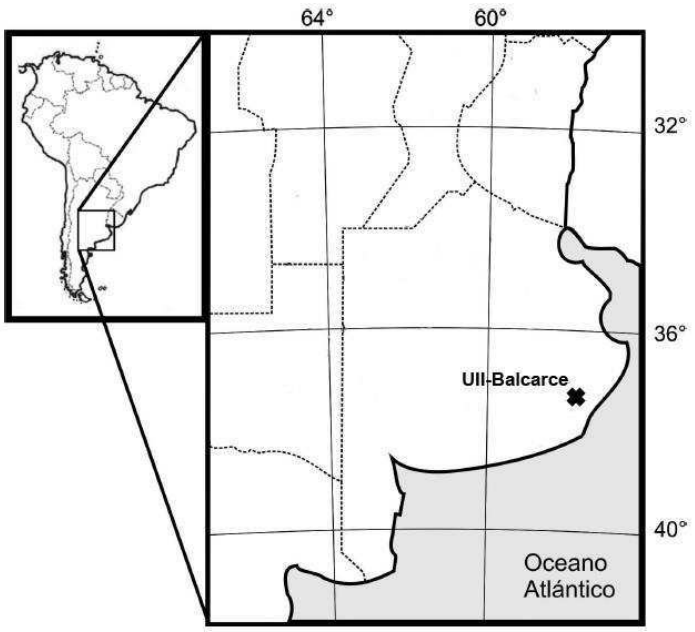


Figura 19. **Localización geográfica de la Unidad Experimental INTA Balcarce.**

Para cumplir con los objetivos planteados se tomaron muestras en un experimento de labranzas y rotaciones mixtas de 34 años. El experimento fue llevado a cabo en la Unidad Integrada INTA en Balcarce (Figura 19). El diseño del experimento es de bloques completos aleatorizados con arreglo de tratamientos en parcelas divididas. Para los propósitos planteados se muestrearon 3 subparcelas por tratamiento (Figura 20). Los tratamientos fueron: labranza convencional (LC) y siembra directa (SD). Las parcelas bajo labranza convencional tuvieron ese manejo desde 1976 y las parcelas bajo siembra directa sufrieron labranza convencional desde 1976 a 1993 y luego siembra directa por 16 años hasta el momento del muestreo en Agosto de 2010. Las rotaciones variaron entre pasturas, soja, trigo y maíz. Las subparcelas muestreadas recibieron una fertilización de 60 Kg N/año y el mismo tipo de rotación. La fuente de nitrógeno utilizada fue urea aplicada al voleo en V6 (sexta hoja) para maíz, en macollaje para el trigo y en R1 (inicio de floración) para soja. El tamaño de las unidades experimentales es de 10m x 17,5 m (175m^2). Los suelos muestreados fueron clasificados como un complejo de Argiudol típico (Serie Mar del Plata) y Paleudol petrocálcico (Serie Balcarce). La temperatura anual media fue de 13,8°C y la precipitación anual media de 875 mm. La última rotación previa al muestreo fue maiz-soja. Se recolectaron 2 submuestras de suelo por subparcela. Se utilizó un barreno para tomar los primeros 20cm del perfil de suelo.

También se tomaron muestras en el parque asociado al casco. Se seleccionaron tres sectores y allí se tomaron dos sub-muestras por sector. Estas muestras corresponderán a la referencia, o control.

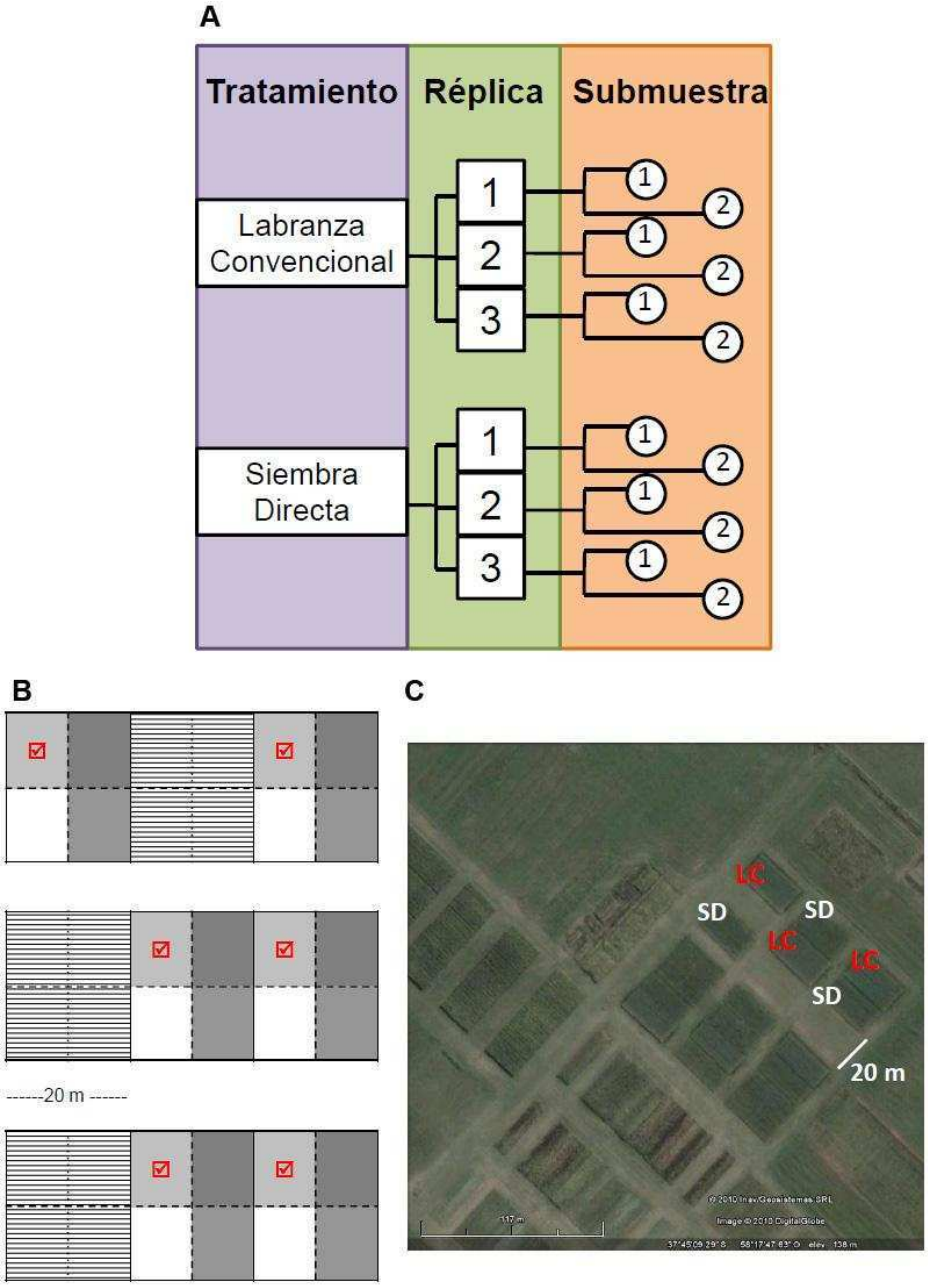


***Figura 20*: A) Diseño de muestreo B) y C) Diseño e imagen satelital del experimento de Balcarce. Se señalan las subparcelas (réplicas) muestreadas con tildes rojos. Los tonos de grises corresponden a distintos grados de fertilización nitrogenada, solo se muestrearon parcelas con 60 Kg N/año.**

Análisis físico-químicos

Las mediciones de propiedades físicas y químicas de los suelos muestreados se realizaron, en colaboración con el grupo del Ing. Roberto Álvarez de la Facultad Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. La textura (i.e. % de arcilla, % de limo, % de arena) fue determinada por el método del hidrómetro [147]. El porcentaje de carbono orgánico fue determinado por el método de digestión húmeda [148]. El pH se calculó usando una solución suelo:agua de 1:2,5. La salinidad se calculó como medida de la conductividad eléctrica [149]. El fosforo extractable se determinó con el método de Bray [150]. El nivel de nitratos se analizó mediante extracción en KCL 2 M y el método del ácido fenoldisulfónico y el porcentaje de nitrógeno mediante el método de Kjeldahl [151].

Extracción de ADN y preparación de bibliotecas y secuenciación

Se extrajo ADN y se prepararon las bibliotecas de amplicon y shotgun sequencing según los procedimientos explicados en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I- Partes A y B.

Procesamiento de secuencias y análisis numéricos

Para el procesamiento y análisis de los datos de secuencias de amplicones del gen 16S ARNr se utilizó la plataforma QIIME [152], siguiendo los mismos pasos descriptos en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I-Parte A. El análisis numérico también fue equivalente al explicado en el Capítulo I- Parte A. La cantidad de secuencias por muestras varió entre 1.311 y 5.092.

Para el procesamiento y análisis de datos de secuenciación shotgun se utilizó el servidor MGRAST con los métodos descriptos en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I-Parte B. El análisis numérico también fue equivalente al explicado en el Capítulo I- Parte B. La cantidad de secuencias por muestras alcanzó un promedio de 304.258.

Resultados

Patrón de diversidad beta de las comunidades microbianas de suelos bajo siembra directa y labranza convencional

El primer paso de análisis se enfocó en corroborar los resultados obtenidos para suelos de la Pampa Ondulada. La evaluación por PCoA permitió distinguir dos grupos de comunidades: las de suelos con y sin historia de manejo agrícola (Figura A3-Anexo). Vimos así que el efecto del uso agrícola es evidente a distintas latitudes en la región.

La visualización por PCoA de las distancias calculadas entre las comunidades muestreadas en el experimento permitió distinguir un patrón que divide a las comunidades según el tratamiento, LC o SD (Figura 21). Este patrón se observó para las dos distancias cuantitativas utilizadas (i.e. weighted Unifrac y Bray Curtis). Las pruebas de ANOSIM y PERMANOVA confirmaron la significancias de los ordenamientos (Tabla 3). El patrón de diversidad beta cualitativo obtenido con unweighted Unifrac permitió visualizar una separación menos precisa de las comunidades según el tipo de manejo, las elipses de los desvíos estándar se solaparon (Figura 21). Sin embargo los análisis por ANOSIM y PERMANOVA permitieron evidenciar una separación según el manejo (i.e. SD y CT) para esa métrica cualitativa.

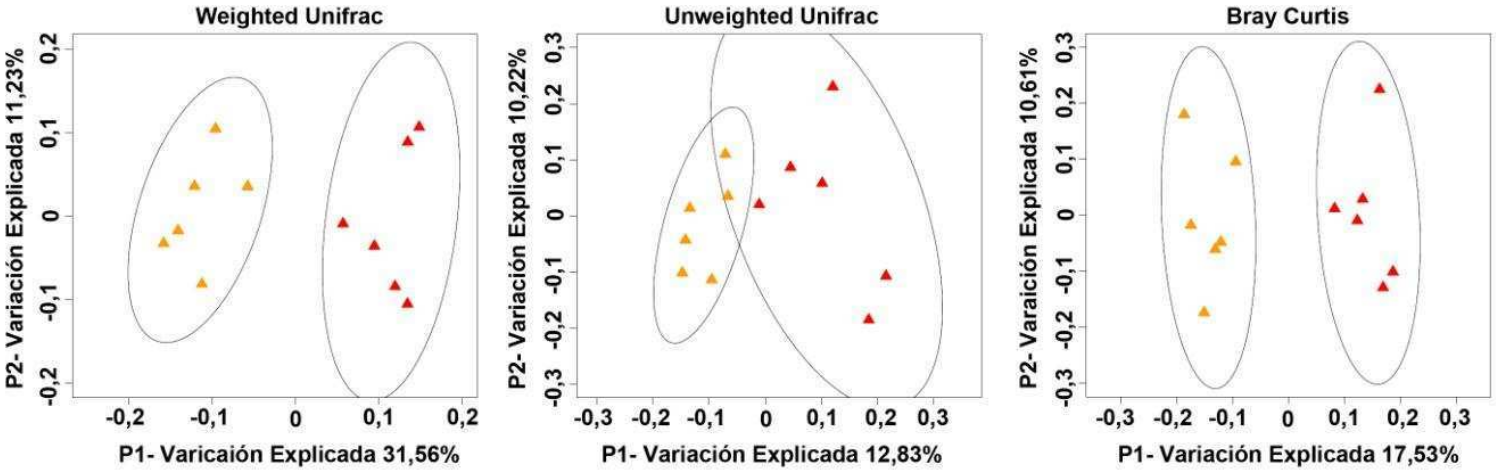


***Figura 21*: Patrón de diversidad beta de las comunidades de suelos bajo SD (Rojo) y bajo CT (Naranja) en el experimento de Balcarce. Las elipses determinan un límite de confianza de 95%.**

***Tabla 3*: Significancia del agrupamiento de las comunidades según el tratamiento SD o LC para las distintas distancias evaluadas**

Test/ Distancia	Weighted Unifrac	Unweighted Unifrac	Bray Curtis
ANOSIM R	**0,93**	**0,49**	**0,90**
ANOSIM p	**0,002**	**0,002**	**0,001**
PERMANOVA R2	**0,29**	**0,12**	**0,17**
PERMANOVA p	**0,002**	**0,002**	**0,002**

El mayor valor de R para métricas cuantitativas que cualitativas en el test de ANOSIM revela la importancia de la cantidad de OTUs en la estructura de las comunidades. La variación explicada por los dos primeros ejes de los ordenamientos de PCoA acompaña este resultado. La mayor variación es visualizada al utilizar weighted Unifrac como medida de diversidad beta. Como se comentó en el Capítulo I- Parte A, weighted Unifrac mide las distancias filogenéticas entre comunidades, dando idea del cambio evolutivo que sufrieron las mismas.

Relación de las variables del suelo con el patrón de comunidades

Utilizamos el test de BIOENV para evaluar la correlación de las variables físico-químicas del suelo con el patrón observado para las comunidades microbianas (Tabla 4). Se utilizó el valor promedio de las distancias calculadas por subparcela.

***Tabla 4*: Características físico- químicas de los suelos muestreados en Balcarce.**

Manejo	Labranza Convencional			Siembra Directa		
Réplica (subparcela)	**1**	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
Mat. Org. (%)	5,6	5,6	4,8	5,3	4,9	4,8
Arcilla (%)	15	16	15	15	16	16
Limo (%)	26	35	39	40	42	39
Arena (%)	59	49	46	45	42	45
Textura	franco arenosa	franco	franco	franco	franco	franco
Pi. (p.p.m.)	10,22	35,93	34,3	34,19	25,61	17,6
NO_3^{-2} (p.p.m)	12,2	5,4	16,01	25,95	36,91	22,31
N	0,24	0,22	0,22	0,24	0,25	0,21
pH	5,2	5,2	5,2	5,2	5,3	5,2
CE (dS/m)	0,17	0,14	0,11	0,16	0,16	0,13

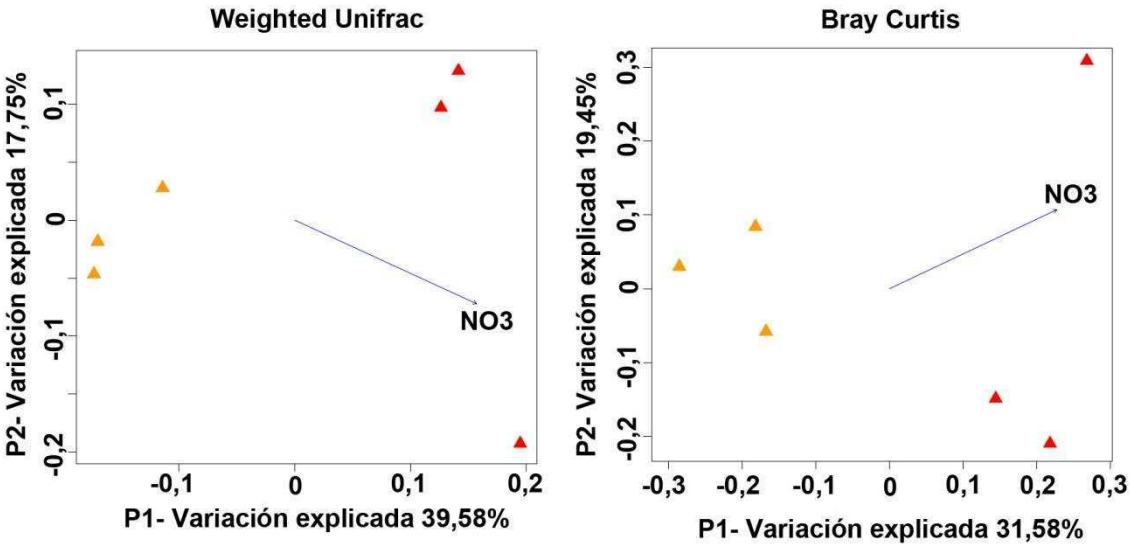


***Figura 22*: Correlación de variables físico-químicas del suelo con el patrón de diversidad beta de las comunidades de suelos bajo SD (Rojo) y LC (Naranja).**

Solo el nivel de nitratos correlacionó con el patrón de diversidad observado (Figura 22, p≤0,01). El valor de correlación fue de r= 0,76 para el patrón de weighted Unifrac y de r= 0,77 para Bray Curtis.

Diferencias en la composición taxonómica de las comunidades de suelos bajo labranza convencional y siembra directa

Se encontraron diferencias al comparar las composiciones taxonómicas de las comunidades de suelos bajo SD y LC. Los phyla *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, TM7 y la clase *Gammaproteobacteria* fueron más abundantes en suelos bajo LC. Mientras que los representantes de los phyla *Nitrospirae*, WS3 y de la clase *Deltaproteobacteria* fueron más abundantes en suelos bajo SD (Figura 23, p≤0,05).

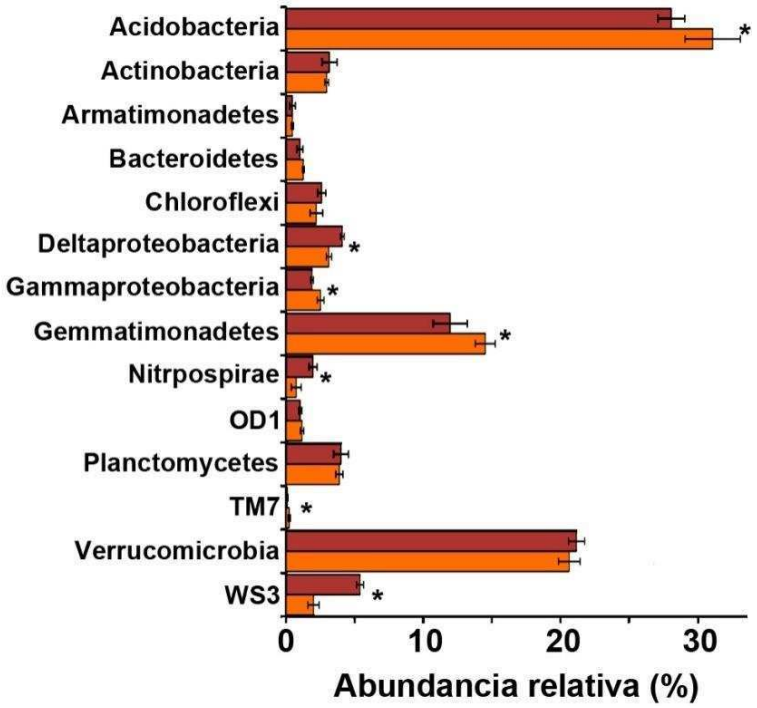


***Figura 23*: Promedio de las abundancias relativas de los taxa más abundantes en las comunidades de suelos bajo SD (Rojo) y LC (Naranja). Las barras indican ± 1 desvío estándar, (*) indica diferencias significativas, p≤0,05**

Diferencias de los perfiles metabólicos de microbiomas de suelos bajo labranza convencional y siembra directa

Se analizó el patrón de variación de los perfiles metabólicos mediante un PCoA basado en distancias euclidianas calculadas a partir de las abundancias de clusters de ortólogos (COGs) para microbiomas de suelos bajo SD y CT. No se observaron diferencias entre tratamientos (Figura 24). Los puntos en el gráfico de PCoA se superponen y las pruebas de ANOSIM y PERMANOVA arrojaron resultados no significativos (p≥0,05). Al evaluar la correlación de la matriz de metabolismos con la matriz de diversidad beta mediante la prueba de Mantel, el resultado también fue no significativo. No se observó correlación entre ambos patrones de variación.

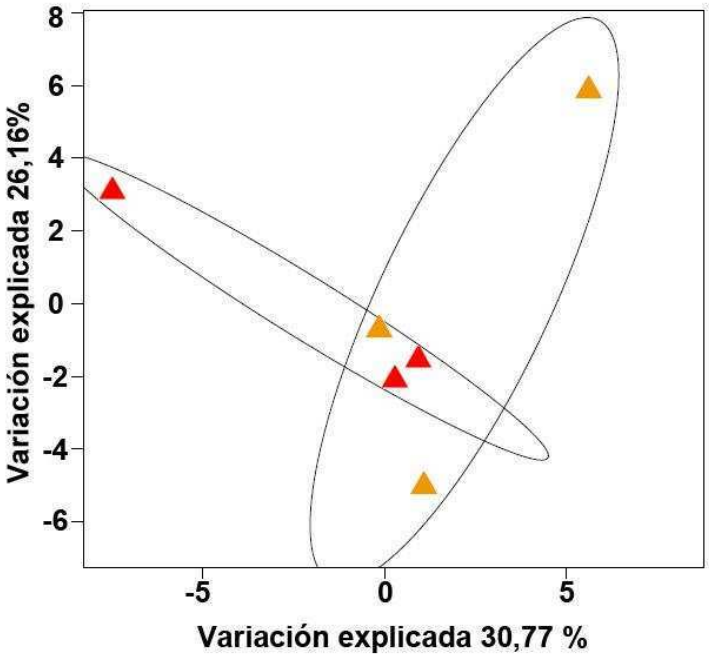


***Figura 24*: Patrón obtenido a partir de los perfiles metabólicos de las comunidades de suelos bajo siembra directa (rojo) y labranza convencional (naranja). Las elipses determinan un límite de confianza de 95%.**

Si bien no se observaron diferencias en el perfil completo de metabolismos, si se detectaron cambios en las categorías puntuales de COGs (Figura 25, $p \leq 0,05$). Las secuencias asignadas al tráfico intracelular, vesicular y secreción de proteínas, transporte de aminoácidos y producción de energía fueron mayoritarias en suelos bajo labranza convencional (figura 25). También se observaron diferencias de algunos COGs dentro de las categorías funcionales (figura 26).

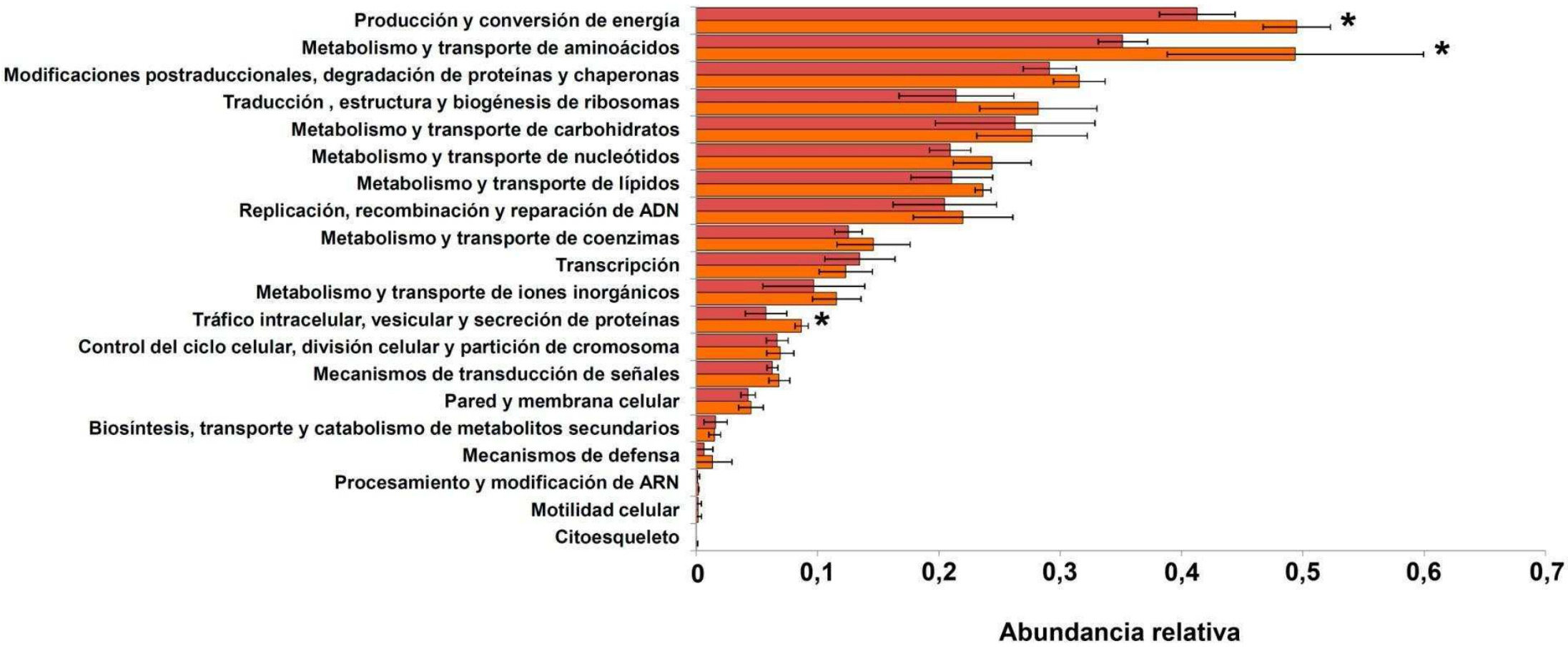


Figura 25: **Promedio de las abundancias relativas de asignaciones (hits) respecto del total de secuencias por muestra para cada categoría de COGs. Rojo corresponde a suelos bajo siembra directa y naranja a suelos bajo labranza convencional. Las barras indican ± 1 desvío estándar, (*) indica diferencias significativas, p≤0,05**

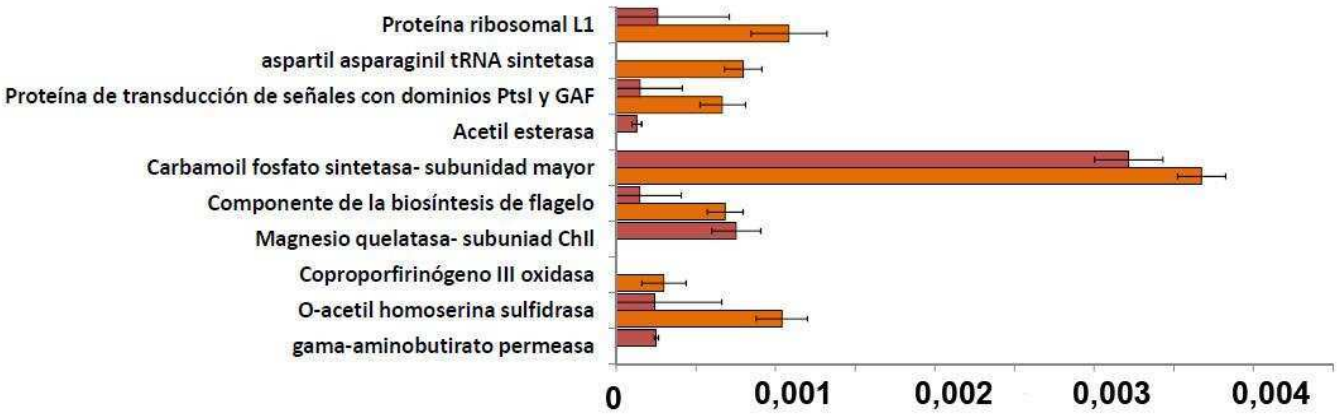


Figura 26: **Promedio de las abundancias relativas de asignaciones (hits) respecto del total de secuencias por muestra para cada COG. Rojo corresponde a suelos bajo siembra directa y naranja a suelos bajo labranza convencional. Las barras indican ± 1 desvío estándar. Se muestran solo los COGs significativos, p≤0,05**

Discusión

El análisis de diversidad beta demostró que existen diferencias en las estructuras de las comunidades bajo distinto tipo de manejo agrícola. Las distancias cuantitativas demostraron el gran peso que tiene la diferencia de abundancias entre comunidades de ambos tipos de suelo. El análisis que no tuvo en cuenta las abundancias, también demostró la existencia de diferencias entre LC y SD. Como vimos en el capítulo I-parte A, el perfil basado en matrices de weighted Unifrac explicó mayor variación entre las comunidades, sugiriendo que esa diferencia evolutiva se corresponde con distintos cambios adaptativos acumulados por las comunidades de suelos bajo SD o LC.

El análisis en la composición taxonómica evidenció a cuales organismos pertenecen las diferencias en abundancias. Los phyla *Gemmatimonadetes*, y *Acidobacteria* fueron más abundantes en suelos bajo labranza convencional, mientras que *Nitrospirae* y WS3 estuvieron más representados en suelos bajo siembra directa. Son conocidos los efectos que las labranzas agrícolas convencionales han producido en los suelos de la Región Pampeana. Entre ellos se destacan la degradación de la estructura del suelo con pérdida de estabilidad y de macro agregados, y la disminución de materia orgánica particulada y de sustancias húmicas [206, 207]. Como resultado se tienen suelos con baja cantidad de macro agregados y mayor cantidad de micro agregados, pero empobrecidos en materia orgánica. Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que la utilización de sistemas de siembra directa tiene efectos positivos sobre la recuperación de la estabilidad, de la cantidad de macroagregados del suelo y de sustancias húmicas [140, 208-211]. Como mencionamos en el Capítulo I, consideramos a los suelos bajo uso agrícola como ambientes copiotróficos respecto de suelos no disturbados, debido a la adición de nutrientes por fertilización y mantenimiento de residuos. También mencionamos un mayor nivel de heterogeneidad ambiental en los suelos agrícolas a causa de la rotación de cultivos, la fertilización y aplicación de agro-químicos y los cambios en la estructura por la labranza. En este caso, las parcelas estudiadas estuvieron sujetas al mismo patrón de rotación de cultivos, recibieron la misma cantidad de fertilización, pero el efecto de los sistemas de labranza en su estructura y la cantidad de residuos vegetales recibidos en cada campaña fue diferente. Los suelos bajo siembra directa mantuvieron los residuos luego de cada cosecha, mientras que los suelos bajo labranza convencional mantuvieron menor cantidad de residuos. Por otro lado asumimos que las diferencias arriba mencionadas en la estabilidad y cantidad de agregados y de materia orgánica y sustancias húmicas está presente en nuestros suelos de estudio. Bajo estas premisas, un aumento en la cantidad de *Nitrospirae* parece estar indicando una mejor adaptación

de la comunidad bajo SD a la utilización de nitrógeno en presencia de sustancias húmicas. En otras palabras, esta comunidad de microorganismos podría aprovechar mejor el nitrógeno menos disponible debido a la complejidad de las formas recalcitrantes de materia orgánica. Previamente ya se han reportado cambios en la oxidación del amonio por una disminución en su disponibilidad debido a la presencia de sustancias húmicas [212]. La oxidación del amonio, el primer paso de la nitrificación, suele definirse como el paso limitante del proceso, sin embargo existen ya evidencias de que ambos pasos (i.e. oxidación de NH_4^+ y la oxidación de NO_2^-) son importantes y limitantes, sobre todo en suelos disturbados [213, 214]. Proponemos que la diferencia de estructura entre suelos bajo SD y LC generan diferencias en los niveles de concentración espacial de NH_4^+ y de NO_2^-. En suelos bajo SD, con estructuras más estables, mayor cantidad de macroagregados, y mayor cantidad de sustancias húmicas, el gradiente de disponibilidad de nitrógeno será mayor, mientras que en suelos bajo LC, será mejor. La mayor abundancia de *Nitrospirae* podría estar siendo ventajosa frente a esta variedad de nichos. Los niveles de otros oxidadores de nitritos como *Nitrobacter* no presentaron diferencias entre tratamientos (Figura A4-Anexo), además los niveles en la comunidad fueron mucho más bajos que para Nitrospirae. Como hemos mencionado en el Capítulo I- Parte A, la diversidad de sublinajes de *Nitrospirae* ocupa diferentes posiciones en una escala imaginaria que va de estrategas-K a estrategas-r; y los niveles de NO_2 definen la abundancia y distribución espacial de estas poblaciones [177]. Otros autores ya han propuesto una relación entre la heterogeneidad ambiental a nivel de la matriz de agregados del suelo, y la diversidad bacteriana [178], proponemos que la mayor abundancia de *Nistrospirae* en suelos bajo SD estará reflejando este aumento de diversidad frente a las distintas disponibilidades de NO_2. El análisis de taxa a niveles más bajos que el de phylum no permitió revelar la existencia de esta diversidad, la diferencia en abundancias se observa para OTUs que no pueden clasificarse más allá del nivel de orden. Será necesario un análisis filogenético para poner a prueba la hipótesis de mayor diversidad de sublinajes en suelos bajo SD que en suelos bajo LC.

Concordantemente, Taylor et al. han descripto una relación inversa entre los niveles de nitratos y la disponibilidad de la materia orgánica [215]. Los autores adjudican parte de la responsabilidad de este equilibrio a la nitrificación. Proponen que la acumulación de nitratos se da por el aumento en la nitrificación frente a menores niveles de asimilación por parte de organismos heterótrofos a causa de baja disponibilidad de carbono. En el caso de los suelos bajo siembra directa, con mayor cantidad de materia orgánica recalcitrante, es de esperar un comportamiento de este estilo: aumentan los

niveles de nitrificación por parte de autótrofos frente a la asimilación de N por parte de heterótrofos, porque hay menor carbono orgánico disponible [216]. Estas observaciones previas e hipótesis son concordantes con el resultado obtenido sobre la importancia de los niveles de nitratos en la estructura de la diversidad beta de las comunidades de los suelos de Balcarce y con los niveles observados de *Nitrospirae*.

Las comunidades de suelos bajo siembra directa también presentaron mayor abundancia de OTUs clasificados dentro del orden *Syntrophobacterales*, familia *Syntrophobacteraceae*, y del orden *Desulfuromonadales*, del grupo *Deltaproteobacteria* (Figura A5- Anexo). Estos organismos son conocidos por sus capacidades sintrópicas [217-219]. La sintropía es un proceso esencial en el ciclo del carbono. La degradación de polímeros naturales como ser polisacáridos, proteínas, ácidos nucléicos y lípidos hasta CO^2 y CH_4, incluye la acción de una pequeña comunidad de microorganismos que interactúan entre sí [220]. Los organismos metanogénicos solo pueden degradar compuestos de un carbono, es por esto que el acetato, propionato, etanol y homólogos, deben ser primero oxidados por fermentadores sintrópicos como son los representantes de los órdenes *Syntrophobacterales* y *Desulfuromonadales*. Este tipo de colaboración entre microorganismos fue descripto mayoritariamente en suelos de humedales o suelos inundados, como ser los de cultivo de arroz [221, 222]. Sin embargo se han descripto situaciones experimentales donde este tipo de relación existe en ambientes diferentes, como es el caso de microcosmos para degradación de celulosa [223] y en dispositivos de microfluidos que controlan el la estructura microespacial y la comunicación química entre organismos [224]. Ambas situaciones experimentales se aproximan al ambiente de suelos bajo siembra directa, donde se acumulan residuos de las cosechas (rastrojo de maíz para el caso de nuestro experimento), y la estructura del suelo conserva macro y microcagregados que generan microespacios para la interacción intima entre microorganismos [178]. Los rastrojos del suelo componen material lignocelulolítico que puede ser degradado por oxidación anaeróbica. Frente a esto proponemos que la mayor abundancia de microorganismos sintrópicos se debe a la mayor abundancia de estos nichos donde puede darse esta coexistencia en suelos bajo SD [225].

Por su lado las comunidades de suelos bajo LC presentaron mayor cantidad de OTUs clasificados como Gammaproteobacteria (Figura A6- Anexo). El orden Xanthomonadales fue el mayor responsable de esta diferencia. Estos organismos ya fueron previamente asociados a prácticas agrícolas convencionales [226]. Los autores hipotetizan que la mayor abundancia reflejaría una mayor susceptibilidad a patógenos de plantas del grupo *Xanthomonadales* asociada al sistema de labranza, sin embargo

no indagan en que familias o géneros están presenten en las comunidades estudiadas. Además, y contrario a estas predicciones, Mendes et al. observaron gran cantidad de Xanthomonadales en suelos supresivos a enfermdedades, identificando a estos organismos como responsables de la resistencia a patógenos como *R. solani [227]*. En nuestro caso, no encontramos diferencias a nivel de género, solo vemos diferencias en el total de OTUs asignado a Xanthomonadales. Frente a este resultado no podemos hipotetizar sobre la adaptación de este grupo en suelos LC. *Gemmtimonadetes* y *Acidobacteria* también fueron más abundantes en suelos bajo LC. Como mencionamos en el Capítulo I- Parte A, el grupo *Gemmtimonadetes* ha sido clasificado como generalista ya que puede crecer en ambientes con distintos tipos y niveles de nutrientes [170]. Demostramos que este grupo fue más abundante en suelos con historia de manejo agrícola que en suelos sin historia en la Pampa Ondulada. Podemos pensar que la mayor abundancia de *Gemmtimonadetes* en suelos con LC puede deberse a la conocida adaptación de este grupo a suelos más secos [170]. Los suelos manejados con LC suelen tener menor contenido de agua que suelos bajo SD en la Región Pampeana [140]. La mayor abundancia de *Acidobacteria*, por su lado, podría explicarse también por este fenómeno ya que el grupo ha sido previamente caracterizado como bien adaptados a cambios en la hidratación del suelo [228].

En cuanto al análisis de perfiles metabólicos basados en los metagenomas, no pudimos ver diferencias generales entre tratamientos. Las pruebas no paramétricas y la visualización por PCoA de los perfiles no pudieron separar a las comunidades bajo SD y LC en dos grupos. Aún así, al analizar las diferencias de abundancias de COGs entre SD y LC vimos que las categorías relacionadas con el tráfico intracelular y secreción de proteínas, con el metabolismo y transporte de aminoácidos y con la producción y conversión de energía fueron más abundantes en las comunidades de suelos bajo LC. Un análisis dentro de de las categorías nos permitió evidenciar que los COGs más representados en suelos LC respecto de SD están relacionados efectivamente con el metabolismo de aminoácidos y síntesis de proteínas. Dos de los COGs mayoritarios corresponden a enzimas que dependen de S-adenosyl-L-methionine (SAM) o de su riboswitch. Estas enzimas son coproporfirinógeno III oxidasa, involucrada en síntesis de tetrapirroles y la O-acetil-homoserina sulfidrasa, involucrada en el metabolismos del azufre y de cisteínas. Como hemos ya mencionado en el Capítulo I-Parte B, la utilización de riboswitches para la regulación transcripcional puede ser una ventaja en ambientes con variación en los niveles de nutrientes , así como hemos mencionado que la dependencia de SAM suele verse en organismos con

tendencias a la copiotrofía [190, 191]. Otro de los COGs diferenciales fue el de proteínas de transducción de señales conteniendo dominios PtsI y GAF. Estas proteínas forman parte del sistema fosfoenolpiruvato: carbohidrato fosfotransferasa (PTS) que es central para el transporte y regulación de azúcares [229]. Enzimas del PTS ya han sido reportadas como abundantes en genomas de organismos copiotróficos [168]. A su vez, los dominios GAF han sido relacionados con genes del metabolismo del nitrógeno [229].

Por otro lado los COGs más abundantes en comunidades de suelos bajo SD fueron: acetil esterasa, GABA permeasa y magnesio quelatasa. La mayor presencia de acetil esterasas, que hidrolizan esteres, puede estar relacionada con una mayor degradación de hemicelulosa por presencia de residuos tras cosecha [230]. GABA (i.e. alfa-aminobutirato) está relacionado con la comunicación de los microorganismos entre sí y con las plantas [231]. GABA puede ser utilizado además como fuente de carbono y nitrógeno [232]. La enzima magnesio quelatasa es la primera en la síntesis de bacterioclorofila. Sin embargo, la cantidad de OTUs clasificados como *Cyanobacteria* en los suelos estudiados fue muy baja (menor a 0,2% por muestra), y no encontramos diferencias entre SD y LC. Sin embargo, más allá de su baja representatividad (menor a 0,2% por muestra), encontramos mayor abundancia de OTUs clasificados como *Rhodobacterales,* de la clase *Alfaproteobacteria,* en suelos bajo SD (Figura A7-Anexo). Estos organismos están dentro del grupo de las bacterias púrpura del azufre y realizan fotosíntesis anoxigénica utilizando bacterioclorofila y carotenoides como pigmentos fotosintéticos. Ambas observaciones pueden estar relacionadas sugiriendo además la presencia de fotosíntesis en estos suelos. No podemos sacar ninguna conclusión respecto de la adaptación que confiere a la comunidad esta característica frente a las comunidades de suelos bajo LC.

En resumen estos resultados indican ciertas tendencias hacia un estilo de vida más copiotrófico por parte de las comunidades bajo LC, y una mejor adaptación a un suelo más estable con mayor cantidad de macroagregados y de materia orgánica recalcitrante por parte de comunidades de suelos bajo SD.

CAPÍTULO III

Análisis del patrón de distribución espacial de las comunidades microbianas de suelos en la Región Pampeana.

Evaluación del patrón biogeográfico desde el marco teórico de Metacomunidades.

El **objetivo** de este capítulo es inferir sobre los procesos que actúan en la determinación del patrón regional de diversidad de las comunidades microbianas de suelos de la Región Pampeana. Se buscará reconocer el grado de responsabilidad de los factores ambientales (contemporáneos) y los factores históricos, como la dispersión, en el patrón biogeográfico.

Frente a las observaciones que realizamos a nivel local en los suelos de la Pampa Ondulada y de Balcarce en los capítulos anteriores, **hipotetizamos** que los factores ambientales, entre ellos el uso del suelo, tendrán más peso que los factores históricos sobre el patrón de distribución y composición de las comunidades microbianas a nivel regional.

Materiales y Métodos

Consideraciones metodológicas

Determinación de factores contemporáneos e históricos

El método de partición de variación es una de las pruebas más utilizadas para investigar los procesos que determinan la dinámica de la abundancia de especies y la composición de comunidades en múltiples localizaciones espaciales [233]. El método consiste en identificar los efectos relativos del ambiente y la ubicación geográfica por medio de la partición de los datos de ocurrencia y abundancia de especies (composición) en diferentes componentes de varianza. Se determinan los componentes de variación "puramente" ambientales, los "puramente" espaciales y la interacción entre ambos. Técnicamente, el análisis de partición de variación consiste en una serie consecutiva de análisis de redundancia canónicos (RDA) parciales que se ejecutan con el objetivo de descomponer la varianza total de una matriz respuesta multivariada.

En paralelo, otro enfoque fue propuesto para evaluar el peso de las variables ambientales y espaciales sobre el patrón de comunidades. La estructura espacial puede ser representada por una matriz de distancias geográficas entre puntos de muestreo. Generalmente se calcula la distancia Euclidiana para estos casos. Por otro lado se precisa una matriz de distancias de diversidad beta y una matriz con las distancias entre variables ambientales. Estas matrices se utilizan luego para el cálculo de pruebas parciales de Mantel [234]. Esta metodología permite determinar la correlación entre dos matrices, controlando los efectos de la tercera. En otras palabras, puede definirse la correlación de la matriz de diversidad con la matriz de localización geográfica removiendo los efectos de la matriz ambiental y viceversa para determinar el peso de efectos actuales (ambiente) e históricos (dispersión).

Elegimos usar ambos métodos para responder a los objetivos planteados en este capítulo.

Usaremos indistintamente el término *variación* o *varianza*. No se utiliza en este texto el término *varianza* para definirse a la esperanza del cuadrado de la desviación de una variable respecto a su media.

Distribución de la abundancia de especies, procesos neutrales o de nicho

La distribución de la abundancia de especies (SAD, por sus siglas en inglés) es una descripción del número de individuos observados para las distintas especies presentes en una comunidad [235]. El correspondiente rango o ranking de abundancias (RAC) es

comúnmente utilizado para el análisis de SADs [95, 236]. Los RACs son el equivalente empírico de las SADs teóricas [237].

La distribución de abundancia de especies es una de las más antiguas leyes de la ecología: "toda comunidad describe una curva con muchas especies raras y solo unas pocas abundantes o comunes" [235]. Se han descripto ya más de dos docenas de SADs teóricas [95, 238]. Entre ellas se destacan las que acompañan modelos neutrales o de nicho. La teoría unificada neutral de la biodiversidad formulada por Hubbel propone que la SAD debe ajustarse a una distribución suma-cero multinomial (ZSM, por sus siglas en inglés) [95]. En cambio las teorías de nicho proponen ajustes a otras distribuciones como: log-normal [239], de vara-partida [240], series geométricas [241] o de procesos de ramificación (Zipf y Mandelbrot) [235]. El cálculo de ajuste de los datos de abundancia de las comunidades observados se utiliza para predecir los SADs teóricos [237] y por ende modelos de dinámicas de diversidad.

Sitios y muestreo

Con el fin de abarcar todo el gradiente climático y edáfico de la Región Pampeana, se muestrearon 12 establecimientos (Figura 27 y Tabla 5). Los muestreos fueron realizados en Septiembre de 2011. En este caso se decidió estudiar tres tipos de uso de la tierra y en cada establecimiento se muestrearon un lote agrícola, un parque asociado al casco y una arboleda (Figura 28). Las arboledas se definieron como plantaciones de árboles de más de 30 años, se encontraron especies nativas y no nativas (Tabla 6). En el momento de muestreo todos los lotes agrícolas se encontraban sembrados con trigo. En todos los casos el cultivo antecesor fue soja, excepto para el establecimiento *San Lui*s cuyo antecesor fue girasol y para *Peinetti* cuyo antecesor fue trigo. Todos los lotes se encontraban bajo siembra directa y todos tenían al menos cuatro años de historia agrícola y al menos dos años bajo siembra directa en el momento del muestreo. No se detectó historia de agricultura en los parques al menos por 30 años. Los datos de historia de los lotes y parques fueron recolectados en forma de entrevista con los responsables de los establecimientos. Para cada uso de la tierra se tomaron tres submuestras de suelo de los primeros 20 cm utilizando un barreno (Figura 28). Una vez recolectadas las muestras se mantuvieron refrigeradas y enviadas al laboratorio. Las muestras para extracción de ADN se conservaron a -80 °C.

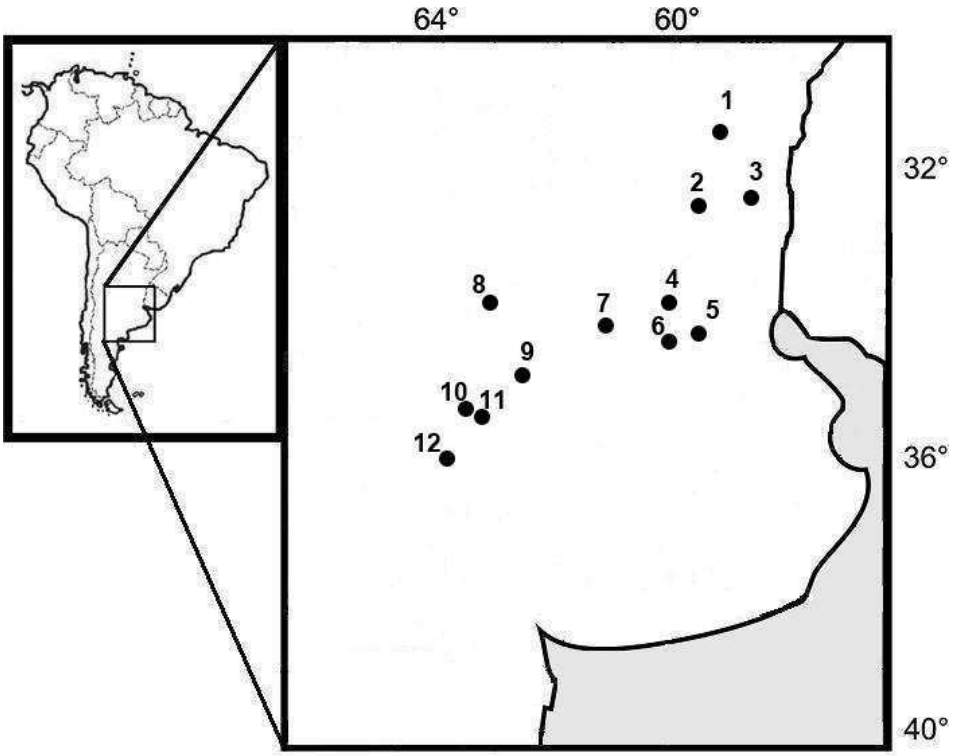


Figura 27. **Localización geográfica de los establecimientos muestreados. (1) San José (2) San Jorge (3) Francou (4) El Alba (5) La Negrita (6) La Estrella (7) El Silencio (8) Los Mirasoles (9) La Caledonia (10) San Luis (11) Pavón (12) Peinetti.**

Tabla 5: **Localización geográfica de los sitios muestreados.**

Establecimiento	Localidad	Uso	Latitud	Longitud
1- San José	**Villaguay**	Agrícola	-31° 40' 59,9"	-59° 14' 04,1"
		Parque	-31° 41' 20,6"	-59° 12' 47"
		Arboleda	-31° 40' 57,2"	-59° 14' 03,3"
2- San Jorge	**Gualeguay**	Agrícola	-32° 54' 22,2"	-59° 42' 49,6"
		Parque	-32° 54' 29"	-59° 42' 41,5"
		Arboleda	-32° 54' 29"	-59° 42' 41,5"
3- Francou	**Concepción del Uruguay**	Agrícola	-32° 33' 22,6"	-58° 23' 57,3"
		Parque	-32° 33' 34,5"	-58° 23' 40,3"
		Arboleda	-32° 33' 17,82"	-58° 23' 53,16"
4- El Alba	**Salto**	Agrícola	-34° 13' 47,2"	-60° 13' 20,6"
		Parque	-34° 13' 42,2"	-60° 13' 10,8"
		Arboleda	-34° 14' 06,2"	-60° 13' 56"
5- La Negrita	**Castilla**	Agrícola	-34° 34' 37,8"	-59° 55' 9,5"
		Parque	-34° 34' 40,2"	-59° 55' 8,1"
		Arboleda	-34° 34' 35,5"	-59° 55' 9,57"
6- La Estrella	**Rawson**	Agrícola	-34° 42' 43,8"	-60° 0.6' 4,7"
		Parque	-34° 39' 27.6"	-60° 06' 0.5"
		Arboleda	-34° 39' 27,6"	-60° 0.5' 53,3"
7- El Silencio	**Vedia**	Agrícola	-34° 28' 18,6"	-61° 20' 40,4"
		Parque	-34° 28' 31,7"	-61° 20' 48,6"
		Arboleda	-34° 28' 33,8"	-61° 20' 48,17"
8- Los Mirasoles	**Ing. Bunge**	Agrícola	-34° 37' 00"	-63° 14' 11,0"
		Parque	-34° 35' 25,8"	-63° 13' 58"
		Arboleda	-34° 36' 29,9"	-63° 14' 11,1"
9- La Caledonia	**Gral. Villegas**	Agrícola	-35° 00' 27,1"	-62° 46' 14,2"
		Parque	-35° 00' 26,6"	-62° 46' 32,5"
		Arboleda	-34° 59' 53,5"	-62° 45' 56,7"
10- San Luis	**Gral. Pico**	Agrícola	-35° 41' 2,7"	-63° 48' 57,3"
		Parque	-35° 41' 15,8"	-63° 49' 7.1"
		Arboleda	-35° 41' 12,3"	-63° 49' 5,9"
11- Pavón	**Agustoni**	Agrícola	-35° 49' 45,6"	-63° 32' 16,6"
		Parque	-35° 50' 11,2"	-63° 33' 25,3"
		Arboleda	-35° 50' 14,8"	-63° 36' 1,1"
12- Peinetti	**Castex**	Agrícola	-36° 0.3' 4,6"	-64° 10' 50,3"
		Parque	-36° 0.3' 3,1"	-64° 10' 45,5"
		Arboleda	-36° 0.2' 23,0"	-64° 10.1' 51,5"

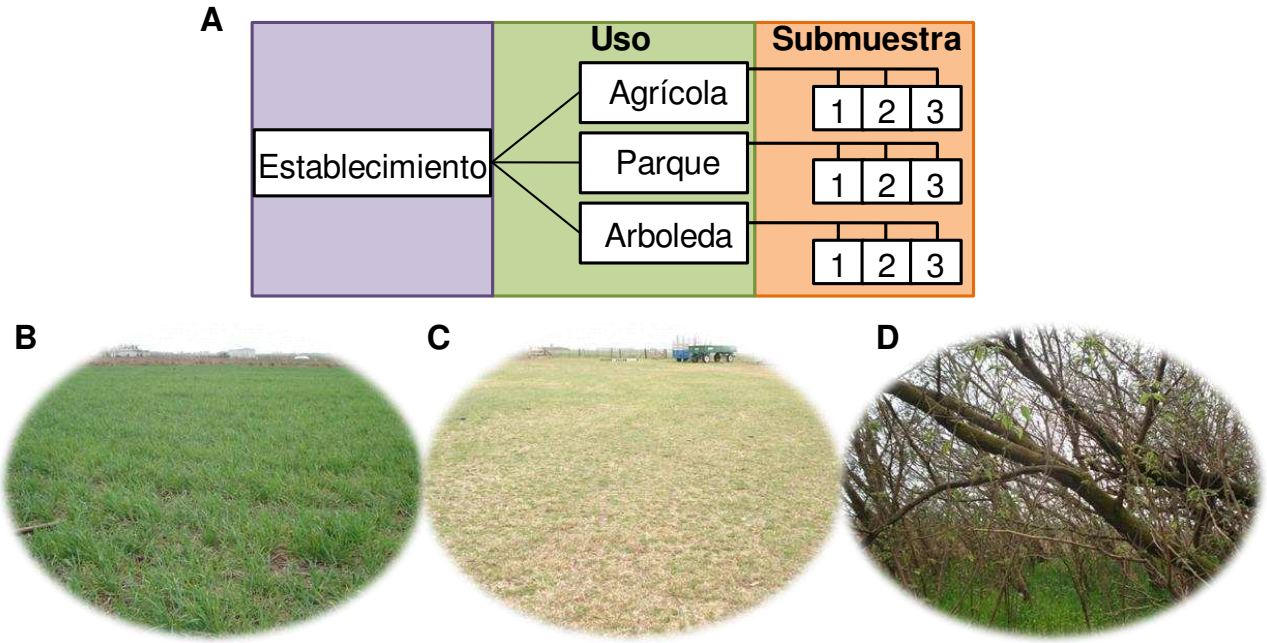


Figura 28: **A) Diseño de muestreo. B) Imagen representativa de un sitio agrícola C) Imagen representativa de un parque D) Imagen representativa de una arboleda. Las imágenes fueron tomadas en el establecimiento *El Alba.***

***Tabla 6*: Taxonomía de suelo, datos climáticos y de especies de árboles y arbustos en los establecimientos muestreados.**

Establecimiento	Clasificación de suelo (USDA)	Especies en arboleda	Temperatura media anual (ºC)	Precipitación media anual (mm)
1- San José	Ocracualf vértico	Ñandubay ,Tala, Espinillo, Chilca, Coronilla	18,23	1120
2- San Jorge	Argiudol vértico	Paraíso, Eucaliptus, Sauce, Ciprés	17,47	1003
3- Francou	Peludert Argílico	Eucaliptus, Tala	17,74	1081
4- El Alba	Argiudol típico	Higuerilla, Paraíso, Ligustro	16,42	1051
5- La Negrita	Argiudol ácuico	Eucaliptus	16,29	1068
6- La Estrella	Argiudol típico	Eucaliptus, Palmera	16,19	1057
7- El Silencio	Hapludol étnico	Eucaliptus	16,06	960
8- Los Mirasoles	Argiudol típico	sin datos	15,96	784
9- La Caledonia	Hapludol típico	Eucaliptus	15,84	799
10- San Luis	Hapludol étnico	Casuarina	15,78	730
11- Pavón	Hapludol étnico	Eucaliptus	15,7	747
12- Peinetti	Hapludol étnico	Eucaliptus	15,71	660

Análisis físico-químicos

La determinación de las propiedades físicas y químicas de los suelos muestreados se realizaron según lo descripto en en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I- Parte A.

Extracción de ADN y preparación de bibliotecas y secuenciación

Se extrajo ADN y se prepararon las bibliotecas de amplicon sequencing según los procedimientos explicados en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I- Parte A. Esta vez se utilizaron 0,25 g de muestra inicial de suelo por sitio.

Procesamiento de secuencias y análisis numéricos

Para el procesamiento y análisis de los datos de secuencias de amplicones del gen 16S rRNA se utilizó la plataforma QIIME [152], siguiendo los mismos pasos descriptos en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I-Parte A. Se obtuvieron en promedio 4.460 secuencias por muestra (entre 872 y 5.203). Se realizaron submuestreos de 654 secuencias (el 75% del total de secuencias de la muestra con menor número) para los cálculos de diversidad beta basados en weighted Unifrac.

La tabla de OTUs construida por rarefacción (i.e. 654 secuencias por muestra) se utilizó para calcular matrices de similitud basadas en la distancia de Bray- Curtis que tiene en cuenta tanto la ausencia y presencia de OTUs como su abundancia [236]. Las matrices de diversidad beta basadas en weighted Unifrac y Bray Curtis se utilizaron para el cálculo de análisis de coordenadas principales (PCoA) y de escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS: non-metric multidimensional scaling). Para determinar la presencia significativa de estructuras o agrupamientos en los datos de diversidad beta se utilizó el test no paramétrico ANOSIM (Clarke 1993) con 999 permutaciones.

Se utilizó el test BIOENV (Clarke and Ainsworth 1993) para determinar que variables físico-químicas del suelo correlacionaron mejor con el patrón de diversidad beta calculado. Como se obtuvo un solo valor por cada variable físico-química evaluada por lote o parque, los datos de OTUs y distancias de las submuestras fueron promediados para este análisis. Se utilizó la distancia de Bray Curtis para determinar la diversidad beta en este caso. La tabla con las variables físico-químicas fue centrada y estandarizada utilizando "Z- scores". Se utilizó el test de Mantel, con 999 permutaciones, para evaluar la significancia de las correlaciones encontradas. Los

análisis numéricos se calcularon usando los paquetes "stats", "vegan" y "BiodiversityR" del entorno R [182]

Para estudiar el aporte de los factores contemporáneos e históricos sobre el patrón de comunidades utilizamos dos métodos numéricos. El primer método fue el de partición de variación [233]. Para generar la matriz de variables espaciales basada en las distancias geográficas utilizamos el método de Componentes Principales de Matrices Vecinas (PCNM) [242]. Se utilizó la matriz de distancias euclidianas entre las localizaciones geográficas de cada sitio. Los autovectores positivos extraídos del análisis de PCNM, utilizando el test de Moran, se usaron luego como descriptores en un análisis de redundancia canónico (RDA), siguiendo las indicaciones de Blanchet et al. [243]. Los autores recomiendan que previo a la selección de variables se realice un test con todas las variables y solo si el test arroja un resultado positivo se proceda a la selección basada en el coeficiente de múltiple determinación (R^2_a). El RDA se calculó usando la tabla de OTUs con valores promedio entre las tres submuestras de cada sitio muestreado, previa transformación de Hellinger. La transformación es necesaria cuando se trabaja con una tabla de composición de comunidad con alto número de ceros, de esta forma se evitan inconvenientes en cálculos lineales [244]. También se calculó un primer RDA utilizando la tabla de OTUs y la matriz de variables ambientales (i.e. características físicas y químicas del suelo) que previamente fue centrada y estandarizada utilizando "Z- scores". Solo se mantuvo la variable de textura "% arena" para evitar problemas de colinearidad en el análisis de RDA. En ambos casos se probó la significancia de los RDA mediante test de ANOVA y la seleccion de variables se hizo con el método de "*Forward selection*" y con un valor de corte de alfa= 0,05 y en base al coeficiente R^2_a. Para los cálculos de este primer método se utilizaron los paquetes "PCNM", "vegan", "stats" y "packfor" del entorno R [182].

El segundo método utilizado fue el de tests parciales de Mantel basados en el coeficiente de correlación de Pearson. Se compararon tres matrices: la matriz de diversidad beta basada en Bray Curtis, la matriz de distancias geográficas y la matriz de variables ambientales. Para las dos últimas matrices se calcularon distancias euclidianas entre sitios. Esta metodología permite estimar la correlación entre dos matrices, controlando los efectos de la tercera. Para los cálculos del segundo método se utilizó el paquete "vegan" del entorno R [182]

Se calcularon los rangos de abundancias (RAC) de las comunidades de cada sitio y se evaluó el ajuste a los modelos de SAD basados en teorías de de nicho: broken-stick (vara- partida), pre-emption (geométrico), log-normal, Zipf y Mandelbrot-Zipf. Para ello se utilizó la tabla de abundancias de OTUs promedio por sitio. Se utilizó la función

radfit() del paquete "vegan" del entorno R para estos cálculos [182]. Para el cálculo de ajuste a la distribución ZSM, que correspondiente al modelo neutral, se utilizó el programa TeTame2.1 [245]. Se evaluó el ajuste a los modelos utilizando el criterio de información de Akaike (AIC); a menor AIC mejor ajuste al modelo [246]. Los valores de AIC para los modelos de nicho son calculados directamente por la función radfit(); en cambio para ZSM, TeTame2.1 devuelve el valor mínimo de verosimilitud ("log-likehood"), por lo que fue necesario una transformación previa para calcular el valor de AIC [247]. La formulada utilizada para el cálculo de AIC fue: AIC= -2 log-likehood+ 2 npar, donde npar corresponde a la cantidad de parámetros del modelo, en el caso de SZM son dos, *m* y θ [95].

Resultados

Los resultados de los análisis físico-químicos pueden observarse en la siguiente tabla:

Tabla 7: Características físico- químicas de los suelos muestreados.

Establecimiento	Uso	Materia Orgánica (tn/ha)	Nitrógeno (%)	Fósforo (ppm)	pH	CIC (cmolc/kg = meq/100g)	arcilla (%)	limo (%)	arena (%)
El Alba	Agrícola	135,072	0,16	26,58	5,25	16,9	11,0	57,0	32,0
	Arboleda	172,032	0,34	112,64	6,16	24,5	6,0	55,0	39,0
	Parque	149,184	0,27	144,78	5,77	23,6	12,0	50,0	38,0
El Silencio	Agrícola	79,632	0,16	30,13	5,4	13,6	3,0	30,0	67,0
	Arboleda	179,424	0,28	100,6	5,90	22,4	3,0	34,0	63,0
	Parque	123,816	0,20	77,25	5,95	15,7	2,0	32,0	66,0
Francou	Agrícola	117,096	0,24	29,37	5,66	36,6	19,0	47,0	34,0
	Arboleda	177,744	0,37	65,33	5,94	40,5	12,0	45,0	43,0
	Parque	168,672	0,31	46,88	6,57	40,6	17,0	44,0	39,0
La Caledonia	Agrícola	56,952	0,18	11,84	5,60	14,2	4,0	36,0	60,0
	Arboleda	65,184	0,29	159,84	4,31	16,4	5,0	33,0	62,0
	Parque	54,264	0,14	137,43	5,26	21,2	2,0	30,0	68,0
La Estrella	Agrícola	129,024	0,23	56,92	5,63	20,1	8,0	56,0	36,0
	Arboleda	177,408	0,32	63,69	4,73	24,6	7,0	51,0	42,0
	Parque	186,312	0,35	137,22	5,35	27,4	3,0	53,0	44,0
La Negrita	Agrícola	88,368	0,19	71,62	5,36	20,5	15,0	51,0	34,0
	Arboleda	126	0,45	85,21	5,53	32,3	8,0	52,0	40,0
	Parque	141,12	0,27	89,10	6,60	23,4	12,0	51,0	37,0
Los Mirasoles	Agrícola	51,912	0,14	37,94	5,24	14,0	6,0	39,0	55,0
	Arboleda	65,184	0,17	67,70	6,83	16,5	5,0	37,0	58,0
	Parque	81,648	0,19	137,8	4,14	16,0	4,0	24,0	72,0
Pavon	Agrícola	27,216	0,15	36,64	6,28	7,1	2,0	6,0	92,0
	Arboleda	67,2	0,12	81,60	5,21	10,0	2,0	18,0	80,0
	Parque	63,588	0,13	79,79	6,17	11,7	2,0	26,0	72,0
Peinetti	Agrícola	89,04	0,16	51,58	5,86	24,7	14,0	46,0	40,0
	Arboleda	175,056	0,42	68,25	5,64	28,3	6,0	40,0	54,0
	Parque	136,08	0,24	76,70	5,62	22,7	9,0	39,0	52,0
San Jorge	Agrícola	103,656	0,19	173,73	6,37	16,6	8,0	67,0	25,0
	Arboleda	94,92	0,37	90,95	4,52	12,4	2,0	70,0	28,0
	Parque	123,312	0,16	84,99	5,24	11,3	3,0	71,0	26,0
San Jose	Agrícola	138,6	0,25	32,16	6,11	38,8	20,0	46,0	34,0
	Arboleda	140,28	0,29	4,78	5,75	39,2	26,0	46,0	28,0
	Parque	163,464	0,36	33,5	5,66	41,1	22,0	39,0	39,0
San Luis	Agrícola	46,62	0,10	32,79	5,70	14,2	10,0	34,0	56,0
	Arboleda	66,276	0,14	55,06	5,49	13,0	6,0	30,0	64,0
	Parque	83,58	0,20	68,12	4,65	15,2	6,0	29,0	65,0

Visualización del patrón de diversidad beta y agrupamientos

El análisis de PCoA permitió la visualización del patrón de diversidad beta basado en weighted Unifrac (Figura 29). Se detectó cierto grado de "efecto arco" [248], por lo cual se calculó también un análisis de escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS). El valor de *stress* obtenido fue suficiente para una representación adecuada de la diversidad de las comunidades: cuanto menor es el valor, mejor es la representación de la diversidad en el ordenamiento. Un valor de stress será ideal si no supera el valor de 0,1 y será confiable hasta un valor de 0,3 [71]. En ambos casos no pudo definirse ningún agrupamiento por uso de la tierra (i.e. agrícola, parque, arboleda). No se distinguieron grupos en la visualización por NMDS y el test de ANOSIM no fue significativo (Tabla 8). Lo mismo sucedió al analizar agrupamientos por

establecimiento o textura del suelo (Tabla 8). Al analizar la diversidad beta basada en la distancia de Bray Curtis, los resultados fueron levemente diferentes (Figura 30). En este caso pudo distinguirse un agrupamiento por establecimiento (ANOSIM p≤0,05, Tabla 8). Sin embargo, el poder de este agrupamiento fue débil ya que se obtuvo un valor de R cercano a cero [71]. La cantidad de variación explicada por los dos primeros ejes del PCoA para weighted Unifrac fue tres veces mayor que para Bray Curtis (48,3% vs.16,4%) y el valor de stress fue más bajo para el NMDS basado en weighted Unifrac.

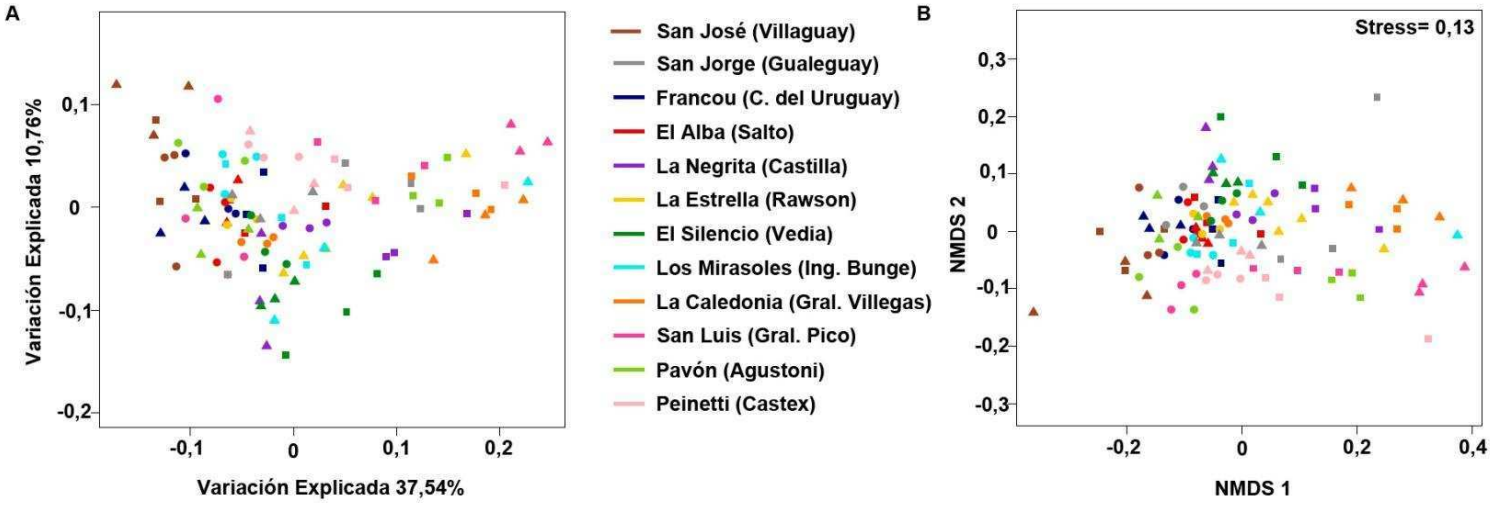


***Figura 29*: Patrón de diversidad beta basado en weighted Unifrac de las comunidades de suelos de la Región Pampeana A) PCoA B) NMDS. Las esferas corresponden a suelos agrícolas, los triángulos a suelos de parques y los cubos a suelos de arboledas.**

Tabla 8: **Pruebas de agrupamiento (ANOSIM) de las comunidades para las distintas distancias evaluadas en la Región Pampeana.**

weighted Unifrac/Grupo	Uso	Textura	Establecimiento
ANOSIM R	-0,002	0,029	0,016
ANOSIM p	>0,05	>0,05	>0,05
Bray Curtis/ Grupo	**Uso**	**Textura**	**Establecimiento**
ANOSIM R	-0,001	0,046	**0,039**
ANOSIM p	>0,05	>0,05	**0,021**

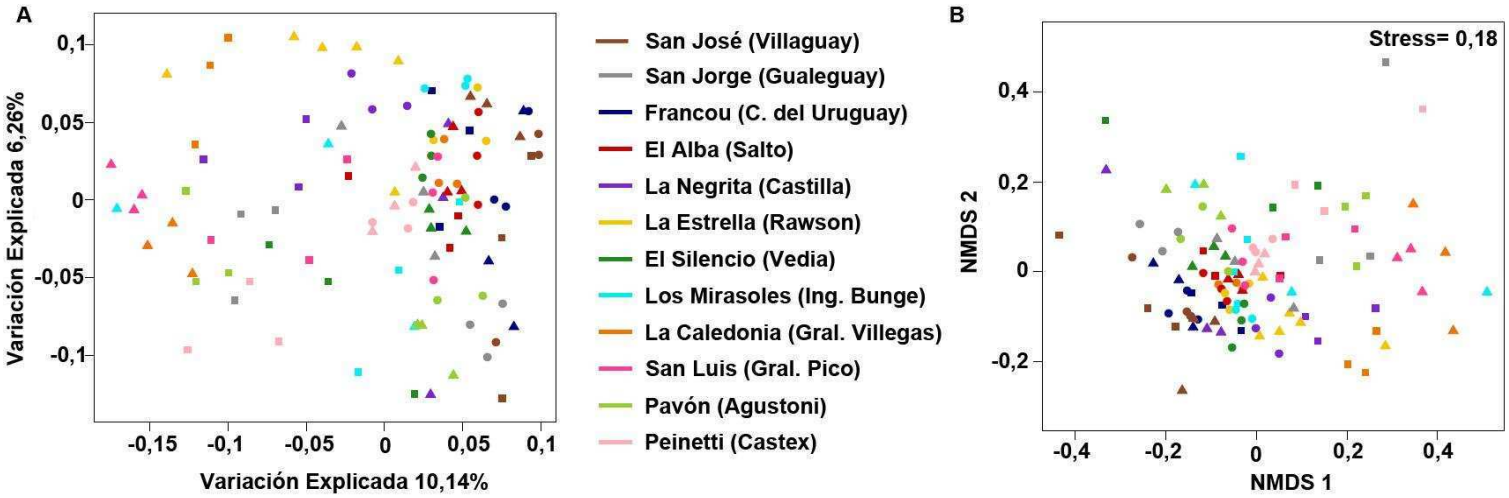


Figura 30 **Patrón de diversidad beta basado en Bray Curtis de las comunidades de suelos de la Región Pampeana A) PCoA B) NMDS. Las esferas corresponden a suelos agrícolas, los triángulos a suelos de parques y los cubos a suelos de arboledas.**

Si bien la prueba de ANOSIM no pudo detectar un patrón claro en base a las variables evaluadas, se pudo observar en los gráficos de PCoA y NMDS una tendencia de los sitios más alejados en la escala geográfica analizada (i.e. Villaguay, Gral. Pico, Agustoni y Gral. Villegas) a una mayor dispersión desde el centro del ordenamiento. También se observó que los puntos que más se alejan corresponden a comunidades de suelos no agrícolas, mientras que los puntos correspondientes a suelos agrícolas se mantuvieron más cercanos al centro del ordenamiento.

Luego, se analizó el peso de las variables climáticas (Tabla 6) y las propiedades físico-químicas del suelo (Tabla 7) sobre la estructura de la diversidad beta. El resultado de

BIOENV indicó que el nivel de lluvias, el contenido de arena y pH del suelo, fueron las variables que correlacionaron con el patrón observado (Figura 31). Se obtuvo un valor del coeficiente de correlación de Spearman de 0,25 (p≤0,001).

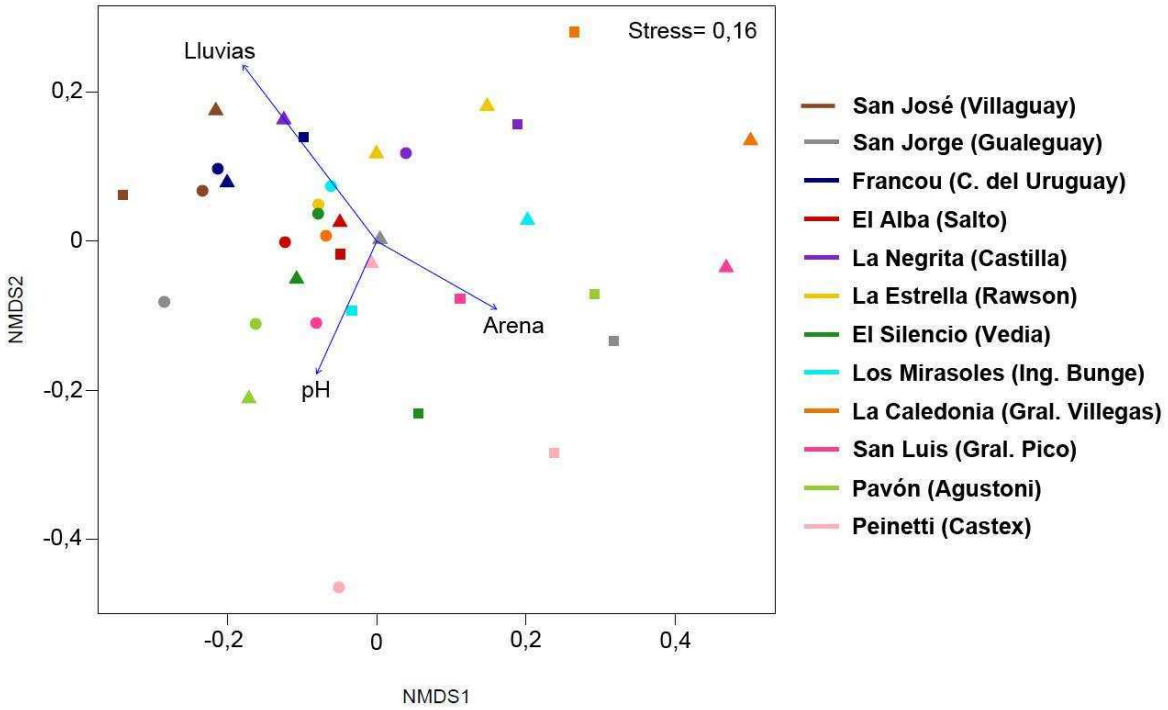


***Figura 31*: Correlación de variables ambientales con el patrón de diversidad beta basado en la distancia Bray Curtis.**

Dado que el valor de precipitación media anual fue la variable más influyente sobre el patrón de diversidad observado, decidimos partir el set de datos en tres según el nivel de lluvias. Un grupo correspondió a los sitios que recibieron alto nivel de lluvias, más de 1080 mm; otro a lluvias medias, entre 960 mm y 1068 mm y un tercer grupo a bajo nivel de lluvias, menos de 800 mm (Tabla 6). Se evaluó, si a una escala espacial menor, se observaba algún agrupamiento significativo de las comunidades. Se calcularon ordenamientos basados en NMDS para evitar problemas por "efecto arco" (Figuras 32 y 33). Los cálculos se hicieron en base a matrices de weighted Unifrac y Bray Curtis. Se observó, para los sitios con alto nivel de lluvias, un agrupamiento de las comunidades por establecimiento (Tabla 9). Para sitios con lluvias medias y altas se observaron diferencias por establecimiento y también se observaron agrupamientos por uso del suelo (Tabla 9). Los resultados coincidieron para ambas medidas de diversidad beta evaluadas. Los agrupamientos fueron, sin embargo, débiles, con valores de R menores a 0,3. No se observaron agrupamientos según la textura del suelo para ninguno de los casos.

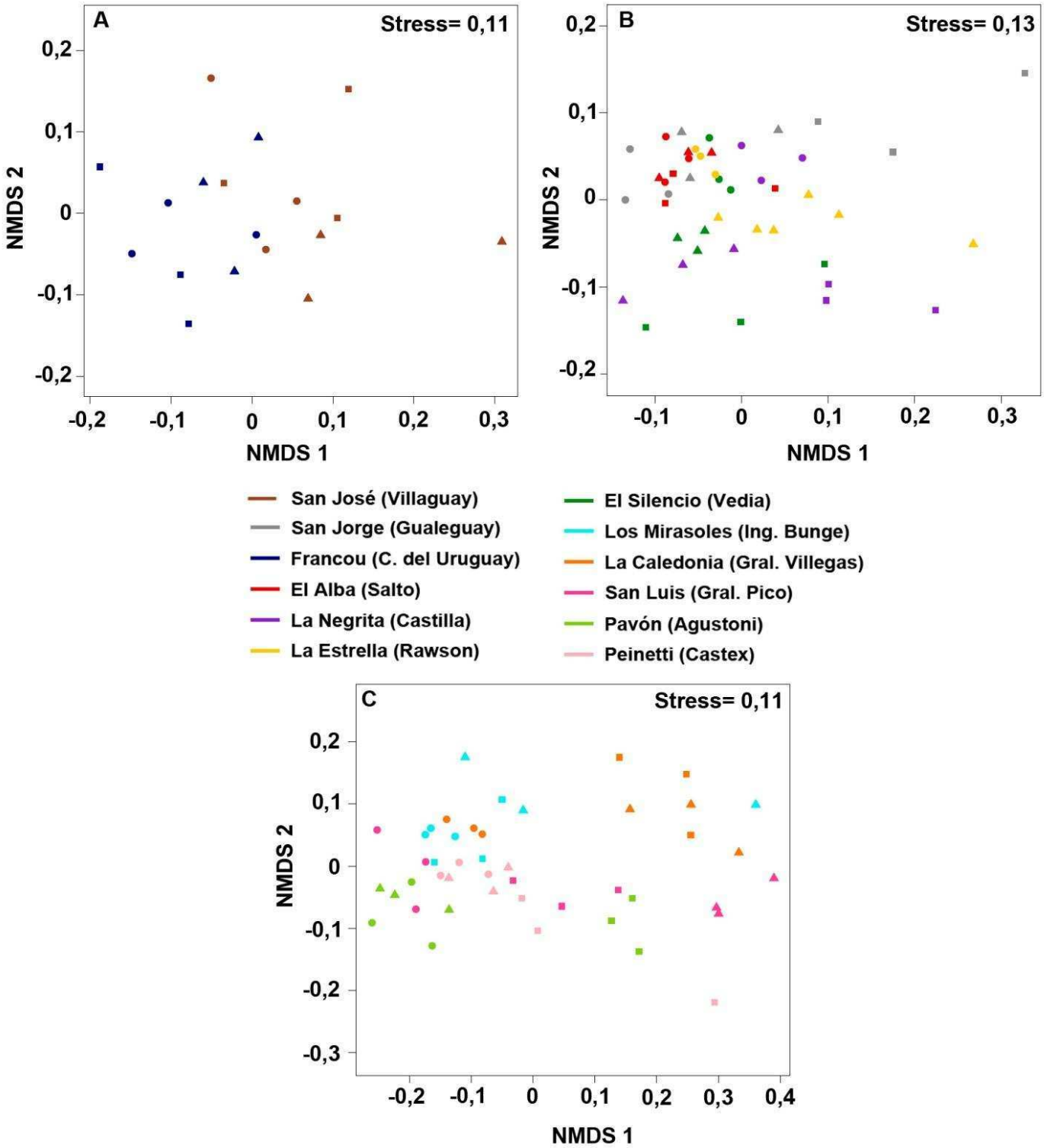


***Figura 32*: Patrón de diversidad beta basado en weighted Unifrac de las comunidades de suelos de la Región Pampeana A) Lluvias altas B) Lluvias medias. C) Lluvias bajas. Las esferas corresponden a suelos agrícolas, los triángulos a suelos de parques y los cubos a suelos de arboledas.**

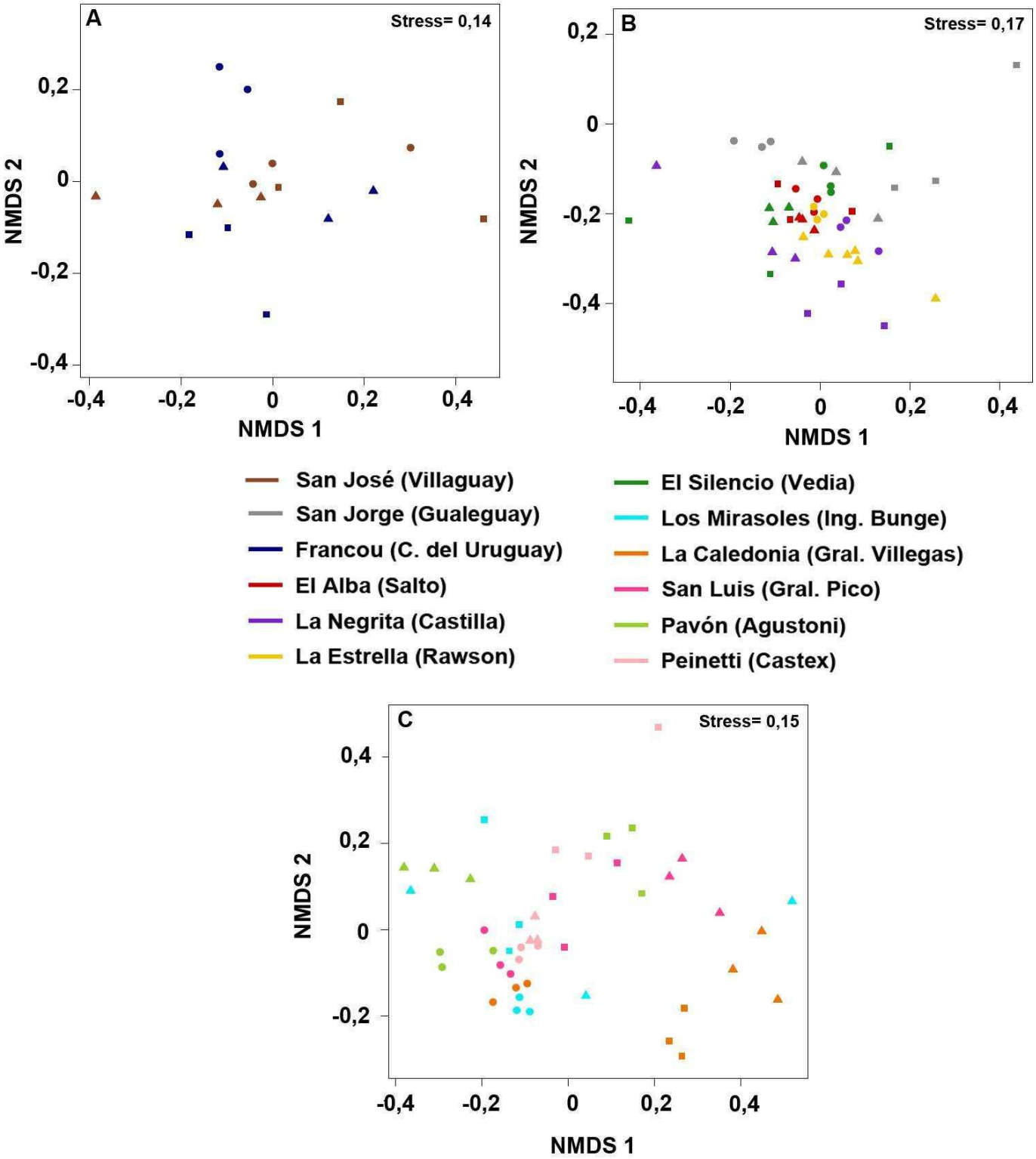


***Figura 33*: Patrón de diversidad beta basado en Bray Curtis de las comunidades de suelos de la Región Pampeana A) Lluvias altas B) Lluvias medias. C) Lluvias bajas. Las esferas corresponden a suelos agrícolas, los triángulos a suelos de parques y los cubos a suelos de arboledas.**

Tabla 9: **Pruebas de agrupamiento (ANOSIM) de las comunidades para las distintas distancias evaluadas por nivel de lluvias.**

Weighted Unifrac		Uso		Textura		Establecimiento	
		R	**p**	**R**	**p**	**R**	**p**
Nivel de lluvias	Alto	-0,007	>0,05	-	-	**0,252**	**0,005**
	Medio	**0,287**	**0,001**	-0,058	>0,05	**0,221**	**0,001**
	Bajo	**0,270**	**0,001**	-0,106	>0,05	**0,219**	**0,001**
Bray Curtis		**Uso**		**Textura**		**Establecimiento**	
		R	**p**	**R**	**p**	**R**	**p**
Nivel de lluvias	Alto	0,003	>0,05	-	-	**0,151**	**0,019**
	Medio	**0,211**	**0,001**	-0,036	>0,05	**0,264**	**0,001**
	Bajo	**0,247**	**0,001**	-0,189	>0,05	**0,269**	**0,001**

Se evaluó también el grado de correlación de las variables de suelo con la estructura de las comunidades microbianas bajo los tres niveles de lluvias (Figura 34 y Tabla 10). Para los establecimientos con altas lluvias las variables que correlacionaron con la variación entre comunidades fueron el nivel de arena y el contenido de nitrógeno. Para los establecimientos en zona de lluvias medias las variables que correlacionaron con el patrón de diversidad fueron el pH y el contenido de materia orgánica. Para el caso de suelos con bajo nivel de lluvias el pH, el fósforo y la conductividad eléctrica fueron las variables correlacionadas. En todos los casos el coeficiente de correlación de las variables con el patrón de diversidad fue mayor que el obtenido a escala regional.

Tabla 10**: Resultados de la prueba de correlación de Mantel basada en el coeficiente de Spearman.**

Nivel de lluvias →	**Alto**	**Medio**	**Bajo**
Coeficiente rho	0,504	0,364	0,496
p	0,03	0,015	0,002

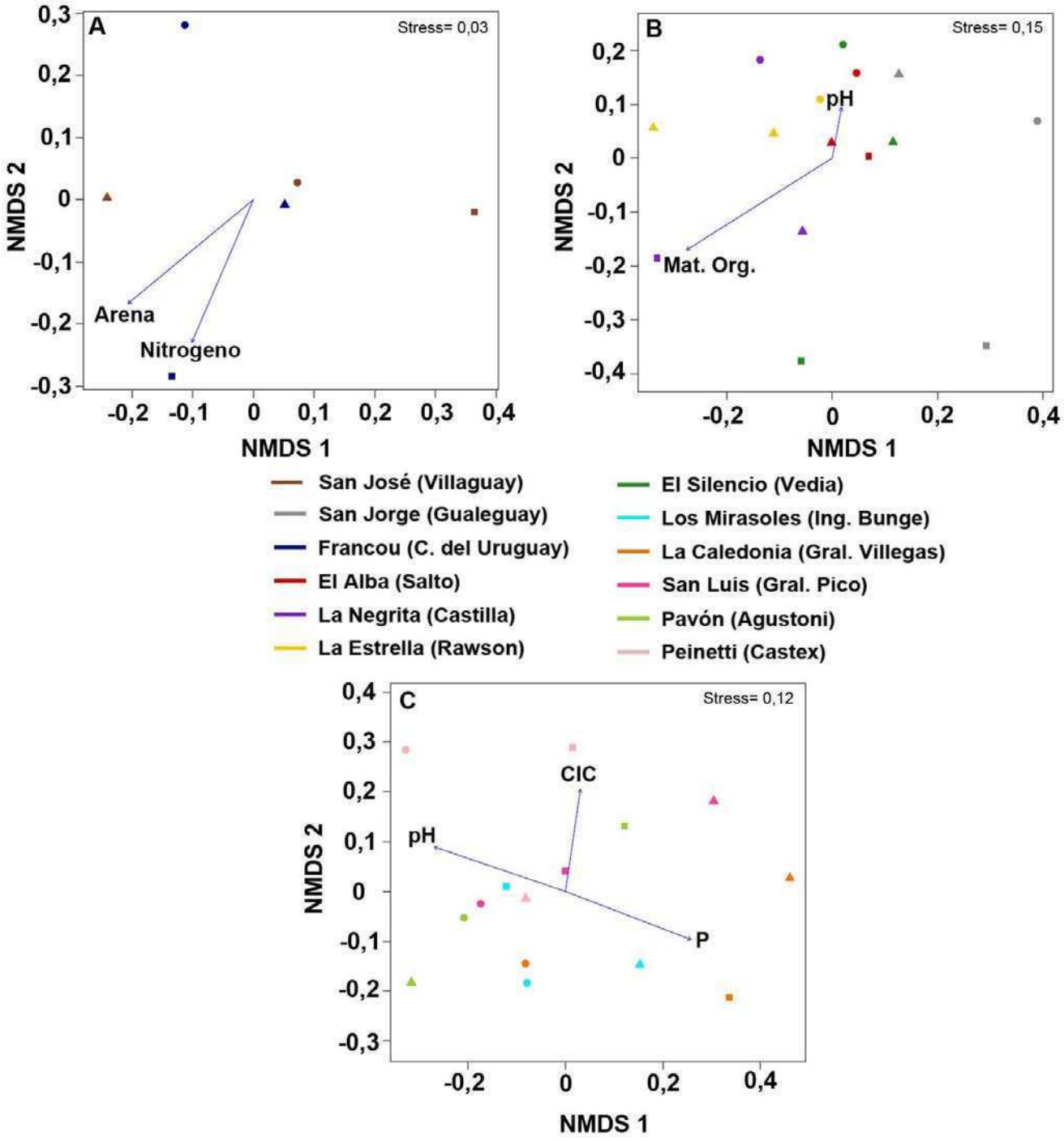


***Figura 34*: Correlación de variables ambientales con el patrón de diversidad beta basado en la distancia Bray Curtis. A) Lluvias altas B) Lluvias medias. C) Lluvias bajas. Las esferas corresponden a suelos agrícolas, los triángulos a suelos de parques y los cubos a suelos de arboledas.**

Observamos que a una escala espacial menor los efectos del uso de la tierra sobre las comunidades microbianas comenzaron a ser evidentes. Frente a esto y a modo de comparación con los resultados obtenidos en el Capítulo I- Parte A, calculamos un

ordenamiento con los datos correspondientes a los establecimientos *La Negrita* y *La Estrella* (Figura 35). Estos sitios son los mismos que fueron analizados en el Capitulo I, las muestras de suelo se tomaron en los mismos lotes agrícolas y en los parques asociados a los cascos en ambos casos. En este caso la reducción de escala espacial fue aún mayor que al dividir el set de datos según nivel de precipitaciones y los efectos del uso de la tierra sobre las comunidades microbianas fueron aún más evidentes. Los puntos correspondientes a comunidades de suelos agrícolas formaron un grupo aparte en el ordenamiento. El test de ANOSIM arrojó un resultado significativo con un valor de R mayor a los casos anteriores (ANOSIM R= 0,577; p≤0,05).

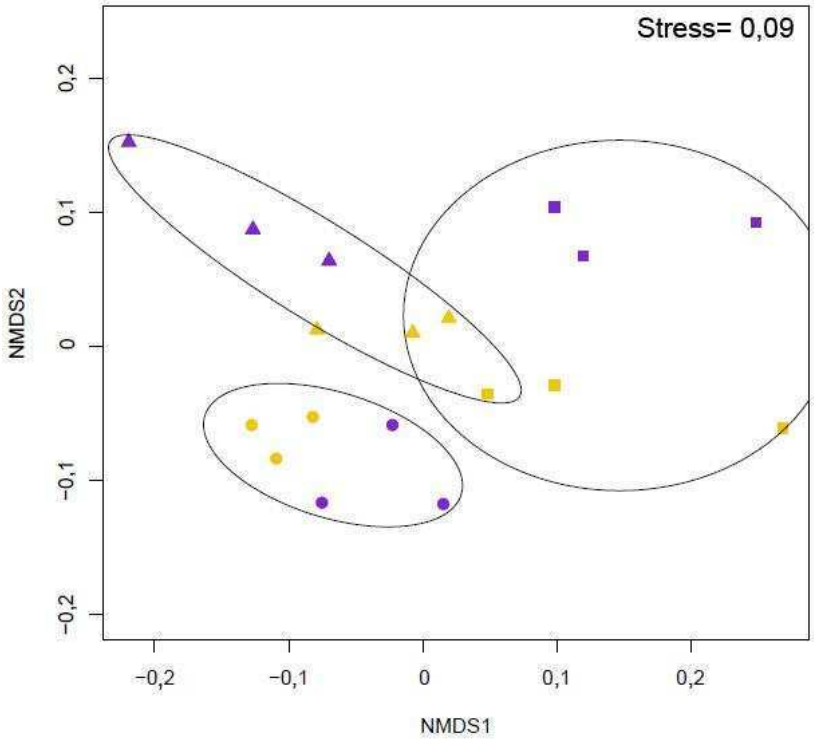


***Figura 35*: Patrón de diversidad beta basado en weighted Unifrac de las comunidades de suelos de La Estrella (amarillo) y La Negrita (violeta). Las esferas corresponden a suelos agrícolas, los triángulos a suelos de parques y los cubos a suelos de arboledas. Las elipses determinan un límite de confianza de 80%.**

Partición de la diversidad beta y correlación de variables históricas y contemporáneas

Para diferenciar entre las influencias de factores ambientales e históricos sobre el patrón de diversidad de comunidades a escala regional utilizamos dos métodos. El primer método fue el de partición de varianzas y se analizó en dos alternativas. Se seleccionaron tres autovectores espaciales y una variable ambiental como predictores

de la variación entre comunidades microbianas. Las variables ambientales evaluadas fueron las características físico-químicas del suelo (Tabla 7) y se seleccionó solo el contenido de arena como predictor. El cálculo de partición de varianza se realizó como primera alternativa para las variables espaciales y de suelo, y en una segunda variante se agregaron, además, las variables climáticas (Tabla 6). Los resultados del primer cálculo mostraron que el efecto de las variables espaciales sobre la diversidad beta fue mayor que el efecto de las variables de suelo (Figura 36). Las variables geográficas explicaron un 7% (p≤0,005) de variación mientras que el efecto del contenido de arena no fue significativo (p>0,05).

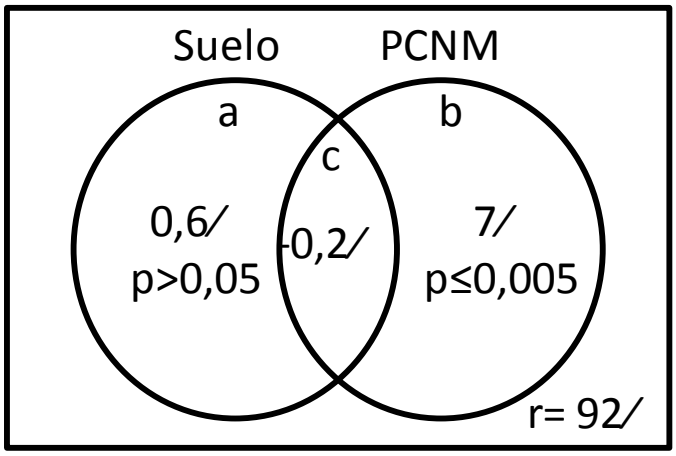


***Figura 36*: Partición de la diversidad beta según los predictores espaciales ("PCNM") y ambientales ("suelo") seleccionados. (a) Corresponde a la variación puramente ambiental; (b) a la variación puramente espacial y (c) a la interacción. (r) Corresponde al valor de los residuales.**

El segundo cálculo de partición de varianza incluyó, además, a las variables ambientales (temperatura y precipitación. Tabla 6). Los resultados mostraron que solo las variables espaciales tuvieron efecto sobre la diversidad beta a escala regional (p≤0,01), el contenido de arena y las variables climáticas no presentaron efectos significativos (p>0,05; Figura 37).

El segundo método utilizado para evaluar las influencias de factores actuales e históricos a nivel regional fue la prueba de correlaciones parciales de Mantel. La correlación de la matriz de diversidad beta (Bray Curtis) con la matriz ambiental (características del suelo), controlando los efectos de las variables espaciales no arrojó resultados significativos (r= 0,1096; p>0,05). En cambio la correlación de la matriz de diversidad beta con variables espaciales, controlando los efectos de las variables ambientales confirmó una correlación débil pero significativa (r= 0,189; p= 0,002).

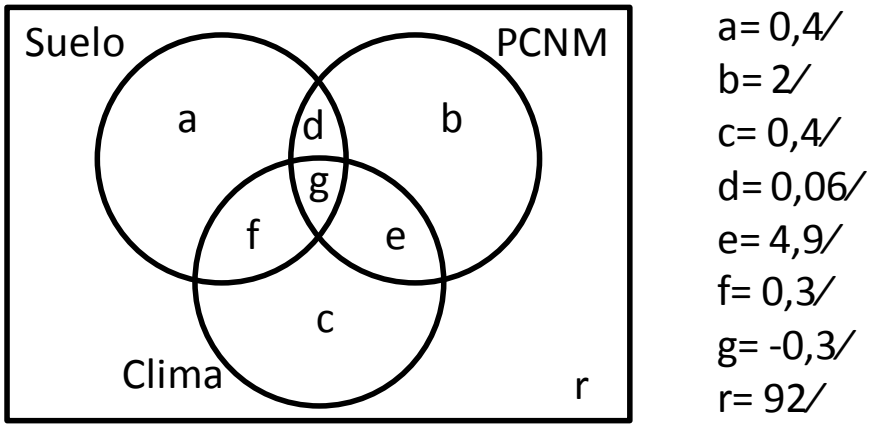


***Figura 37*: Partición de la diversidad beta según los predictores espaciales ("PCNM") y ambientales ("suelo") seleccionados y las variables climáticas ("clima"). (a) Corresponde a la variación puramente ambiental; (b) a la variación puramente espacial; (c) a la variación puramente climática; (d) a la interacción entre efectos de variables espaciales y de suelo; (e) a la interacción entre v de variables espaciales y de clima, (f) a la interacción entre efectos de variables climáticas y de suelo; (g) a la interacción entre los tres tipos de variables y (r) corresponde al valor de los residuales.**

Luego se evaluaron los efectos de factores ambientales e históricos a menor escala espacial para los tres grupos determinados según el nivel de precipitaciones. En el caso de las comunidades de sitios con alto nivel de lluvias no se observaron resultados significativos en el test de ANOVA para las fracciones de variación explicada por variables de suelo o espaciales (Figura 38A). La variación de la diversidad entre comunidades de suelos bajo un nivel de lluvia medio fue explicada en un 3,5% por factores ambientales y en un 2,9% por factores espaciales ($p \leq 0,05$; Figura 38B). Para las comunidades de suelos con bajo nivel de precipitaciones, la variación de la diversidad correspondió en un 10% a factores ambientales ($p \leq 0,005$) y no se detectaron efectos significativos de los factores espaciales (Figura 38C).

Las pruebas de correlación parcial de mantel en el caso de sitios con nivel alto y medio de lluvias no arrojaron resultados significativos en ninguno de los dos casos (i.e. ni al evaluar la correlación de la matriz de diversidad beta con la matriz de variables ambientales, controlando por efectos de factores espaciales, ni al evaluar la correlación de la matriz de diversidad beta con la matriz de variables espaciales, controlando por factores ambientales). Si se observó, en cambio, una correlación entre variables ambientales y la matriz de diversidad beta, controlando los efectos espaciales, para las comunidades de suelos con bajo nivel de precipitaciones (Tabla 11).

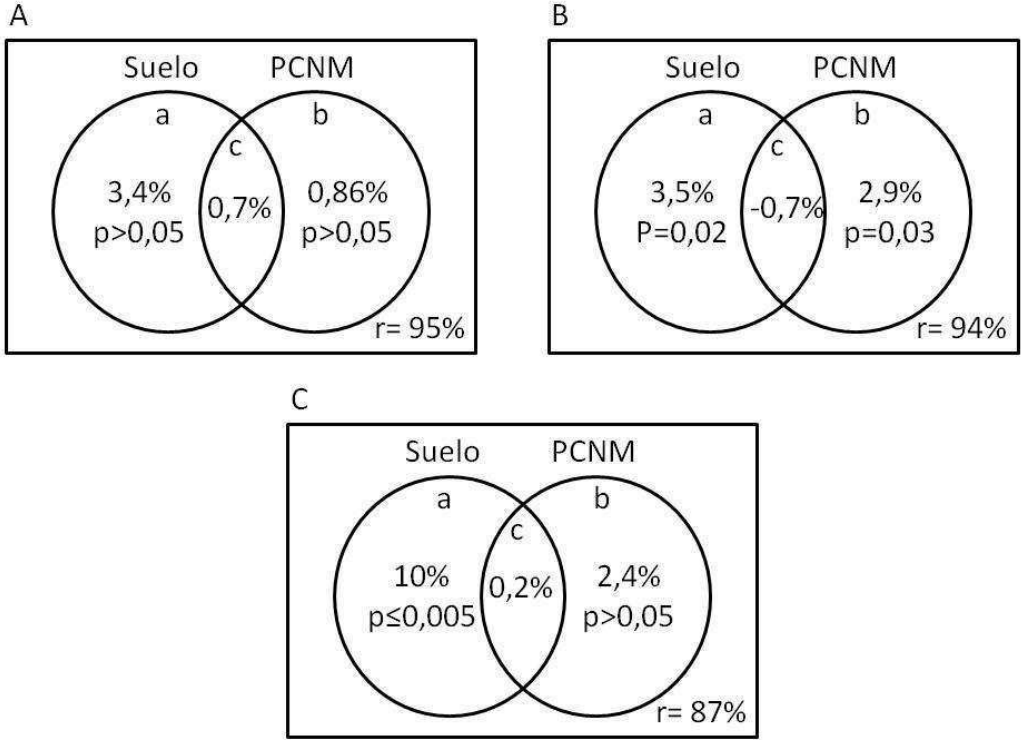


***Figura 38*: Partición de la diversidad beta según los predictores espaciales ("PCNM") y ambientales ("suelo") seleccionados. A) Lluvias altas B) Lluvias medias. C) Lluvias bajas. En cada caso (a) Corresponde a la variación puramente ambiental; (b) a la variación puramente espacial y (c) a la interacción. (r) Corresponde al valor de los residuales.**

***Tabla 11*: Resultados de la prueba parcial de Mantel para grupos de comunidades según el nivel de lluvias. X|Y significa: evaluación de la correlación de la matriz de diversidad beta con la matriz X controlando los efectos de la martiz Y.**

Nivel de lluvias ⟶	**Alto**		**Medio**		**Bajo**	
Ambientales| Espaciales	0,262	p>0,05	0,190	p>0,05	**0,305**	**p=0,037**
Espaciales| Ambientales	0,267	p>0,05	0,178	p>0,05	0,112	p>0,05

Procesos de nicho o neutrales

Como en todos los análisis de partición de variación se observó un alto porcentaje de variación residual, se decidió evaluar el ajuste de las abundancias de cada comunidad a modelos de nicho y al modelo neutral con distribución ZSM predicho por Hubbel [95]. Este análisis se utilizó para determinar si el alto valor de variación no explicado por las variables evaluadas podría deberse a la existencia de dinámicas neutrales de

diversidad sobre las comunidades estudiadas. Los resultados mostraron que para todos los sitios los ranking de abundancias ajustan mejor a la distribución Zipf y Mandelbrot-Zipf que corresponden a distribuciones asociadas a modelos de nicho [237] (Tabla 12 y figura 39). El ajuste al modelo neutral fue el de mayor AIC en todos los casos (i.e. el de peor ajuste).

***Tabla 12*: Criterio de Akaike para el ajuste a los modelos de nicho y neutral por parte de las comunidades de todos sitios analizados.**

Establecimiento	Uso	AIC					
		Vara partida	Geométrico	Log Normal	Zipf	Mandelbrot- Zipf	ZSM
El Alba	Agrícola	914,4	968,0	759,1	**617,2**	619,2	1596,4
	Arboleda	877,4	901,8	745,4	**636,8**	638,8	1678,4
	Parque	875,4	938,1	715,0	**585,4**	587,4	1436,2
El Silencio	Agrícola	784,6	794,8	674,0	**589,1**	591,0	1590,2
	Arboleda	849,3	804,6	727,5	**659,7**	661,7	1894,6
	Parque	833,5	850,5	710,5	**606,7**	608,7	1622,6
Francou	Agrícola	859,9	910,9	713,2	**591,8**	593,8	1728,0
	Arboleda	988,8	1065,4	808,8	**651,9**	653,9	1646,1
	Parque	1005,0	1066,9	833,2	**677,0**	679,0	1750,0
La Caledonia	Agrícola	921,9	952,2	780,4	**653,9**	655,9	1601,8
	Arboleda	985,8	1033,6	827,0	**681,5**	683,5	2118,1
	Parque	945,4	947,0	806,8	**690,9**	692,9	2327,1
La Estrella	Agrícola	891,0	950,9	731,3	**597,0**	599,0	1480,8
	Arboleda	975,4	1060,0	772,7	**605,7**	607,7	1715,9
	Parque	947,7	1011,7	777,7	**630,5**	632,5	1681,7
La Negrita	Agrícola	875,3	909,2	739,3	**618,2**	620,2	1679,0
	Arboleda	1054,0	1119,4	876,3	**694,0**	696,0	1856,5
	Parque	951,4	1009,5	790,0	**638,9**	640,9	1707,4
Los Mirasoles	Agrícola	907,6	984,6	720,1	**565,0**	567,0	1429,2
	Arboleda	871,4	895,5	739,6	**620,7**	622,7	1601,5
	Parque	950,8	918,0	811,3	**715,8**	717,8	1999,1
Pavon	Agrícola	909,1	966,1	753,5	**609,8**	611,8	1686,7
	Arboleda	860,9	865,3	739,2	**641,7**	643,0	1909,3
	Parque	784,7	766,5	688,5	633,5	**629,3**	1849,4
Peinetti	Agrícola	912,8	936,8	776,3	**656,6**	658,6	2290,1
	Arboleda	864,3	863,8	743,7	**649,1**	651,1	2023,1
	Parque	838,6	907,1	671,0	**539,5**	541,5	1410,3
San Jorge	Agrícola	833,0	816,6	720,4	**646,6**	648,6	1864,3
	Arboleda	837,5	844,4	720,8	**625,8**	627,7	1917,2
	Parque	869,5	883,4	739,7	**625,2**	627,2	1599,2
San Jose	Agrícola	953,8	1038,6	760,9	**599,0**	601,0	1625,5
	Arboleda	926,4	1000,3	721,8	**563,9**	565,9	1713,1
	Parque	987,8	1051,6	630,1	**459,5**	461,5	1337,1
San Luis	Agrícola	833,8	880,9	680,3	**567,6**	568,8	1546,8
	Arboleda	805,2	837,6	680,4	**574,2**	576,2	1626,6
	Parque	893,1	944,7	743,6	**611,9**	613,9	2089,1

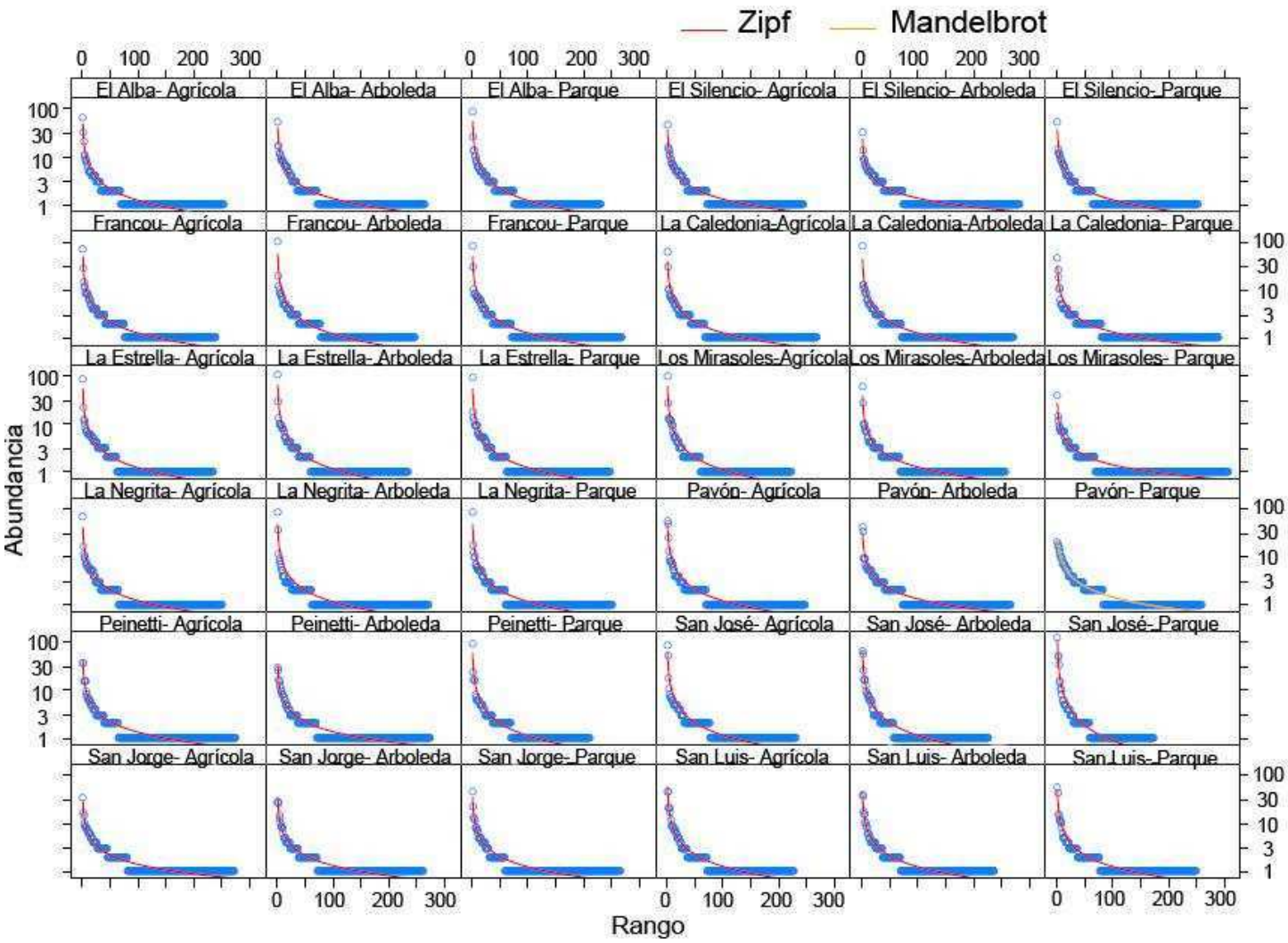


***Figura 39*: Curvas de rango de abundancias y ajustes al mejor modelo.**

Discusión

En este capítulo se evaluó la influencia de efectos ambientales (contemporáneos) y espaciales (históricos) en el patrón de diversidad beta de las comunidades de la Región Pampeana. El primer resultado evidenció que a nivel regional no se distingue un patrón definido por el uso del suelo. El análisis de ANOSIM reveló, aunque débil, un agrupamiento de los datos por establecimiento. Estos primeros resultados apuntan a una mayor contribución de los factores espaciales sobre las comunidades microbianas a nivel regional, que de los factores ambientales. Los análisis de partición de varianza y de correlación parcial de Mantel confirmaron esta tendencia. Solo se observó una contribución significativa a la variación en la diversidad por parte de los autovectores espaciales seleccionados.

En cuanto a las variables ambientales que correlacionaron con la diversidad beta a nivel regional, se destacó el nivel de precipitaciones. Esta es una variable que está ligada a la ubicación geográfica, por este motivo no se la incluyó dentro de los factores ambientales a evaluar en los análisis de partición de varianza y de correlación parcial de Mantel. Sin embargo al incluir los datos climáticos como tercer componente de variación a evaluar (los otros dos fueron las variables espaciales y las características de suelo) no se observó contribución significativa de los mismos a la variación de la diversidad. Se siguió observando, en cambio, el efecto de la distancia geográfica. Estos resultados demuestran que los factores históricos ligados a las distancias entre comunidades, como ser la limitación de la dispersión, serían los principales responsables de la variación en el patrón de las comunidades microbianas de suelos a nivel regional.

Frente a estos resultados podemos descartar al *ordenamiento de especies* como el paradigma más adecuado para explicar el patrón de las comunidades microbianas de suelos de la Región Pampeana. El modelo que explique las observaciones para la región estará entre el *efecto masa* y la *dinámica de parches*. El efecto significativo de las variables espaciales sugiere que los procesos de migración, emigración y dispersión son importantes. El modelo de *efecto masa* acepta la existencia de efectos de la heterogeneidad ambiental en la composición de las comunidades. Sin embargo si los ambientes están suficientemente interconectados, la homogeneización de la composición provocada por el *efecto masa* puede ser tan marcada que el efecto de las condiciones ambientales queda enmascarado a nivel regional. Este parece ser el caso de las comunidades microbianas de suelos de la Región Pampeana. La correlación observada de las variables ambientales con la estructura de las comunidades no se detectó en el análisis que incluye a las variables espaciales. Podría pensarse que esto

tiene que ver con un grado de autocorrelación de las variables espaciales con las variables ambientales, sin embargo la interacción de la variación explicada entre ambas fue negativa. Esto significa que las fracciones son linealmente independientes, sin embargo puede existir una interacción no lineal, no detectada por el método. Es importante destacar que las correlaciones predichas por el método de Bioenv están calculadas sobre matrices de distancia de Bray Curtis, mientras que el cálculo de partición de varianzas se basa en modelos lineales y distancias euclidianas. Sin embargo, las pruebas parciales de Mantel se calcularon utilizando matrices de diversidad beta basadas en distancias de Bray Curtis y tampoco revelaron efectos de las variables ambientales. La principal diferencia entre los modelos de *efecto masa* y de *dinámica de parches* es el grado de limitación en la dispersión. En el primer caso la dispersión es *eficiente* y en el segundo caso es *limitada* [100]. Al no poseer datos de las tasas de dispersión de las poblaciones no podemos distinguir entre ambos paradigmas. Nos inclinamos por el modelo de *efecto masa*, ya que la *dinámica de parches* asume cierta homogeneidad ambiental que no es observada para la Región Pampeana, principalmente por el efecto de los usos del suelo.

Al evaluar las variables climáticas como tercera fracción de variación de la diversidad beta, observamos que las variables espaciales seguían siendo las únicas significativas a nivel regional. Sin embargo, al detectar una correlación significativa de los niveles de precipitación con el patrón de comunidades, decidimos partir el set de datos en tres. Un grupo correspondió a los sitios que recibieron alto nivel de lluvias, otro a lluvias medias y un tercer grupo a bajo nivel de lluvias. Al analizar la contribución de factores actuales e históricos a un nivel espacial menor, vimos que los efectos de las variables ambientales y del uso de la tierra se hicieron evidentes. Los análisis de ANOSIM descubrieron que existe un agrupamiento de las comunidades por establecimiento para los tres niveles de lluvias. Las comunidades también se agruparon según el uso de la tierra en suelos con niveles de precipitaciones medios y altos. Además los coeficientes de correlación con las variables ambientales en todos los casos fueron más altos que para el análisis de toda la región. A su vez, los análisis de partición de varianza mostraron que los efectos de las variables de suelo se hicieron más evidentes al disminuir el nivel de precipitaciones. Para precipitaciones altas el análisis de partición de variación y la prueba de correlación parcial de Mantel arrojaron resultados no significativos. Esto puede deberse a la menor cantidad de réplicas evaluadas en este caso; quizás no fueron suficientes para evidenciar los efectos de las variables espaciales y de suelo. Para el caso de comunidades con nivel medio de precipitaciones se observaron efectos significativos de las variables de suelo y de las espaciales. Para el caso de comunidades con bajo nivel de lluvias se observó que la

fracción de variables de suelo explico un 10% de variación y el test de Mantel fue significativo. Estos resultados demuestran, por un lado, que al bajar el nivel de escala espacial los efectos contemporáneos debidos a las diferencias del ambiente se vuelven evidentes, al disminuir los efectos de factores históricos; y por otro que al disminuir el nivel de precipitaciones los efectos de las variables de suelo son más importantes. Además con la disminución de las precipitaciones se evidenciaron también los efectos del uso del suelo, las comunidades se agruparon según suelos agrícolas, parques o arboledas.

Es importante destacar que para este set de datos se volvieron a observar los resultados obtenidos en el capítulo I. Al evaluar el patrón de comunidades microbianas a una escala espacial pequeña, no regional, en establecimientos de la Pampa Ondulada (*La Estrella* y *La Negrita*), se volvió a evidenciar la separación de las comunidades según la presencia o no de manejo agrícola.

Otra observación a tener en cuenta, es que los análisis de partición de variación revelaron un alto porcentaje de la misma que no es explicada por las variables evaluadas (valores de residuales altos). Puede pensarse dos panoramas posibles para explicar esto. El primero supone que no fueron evaluadas todas las variables ambientales que influyen sobre las comunidades microbianas, con lo cual se estaría subestimando la fracción de variación explicada por el ambiente. La otra explicación es que solo una parte de los procesos que generan la diversidad de las comunidades evaluadas sean explicados por modelos no estocásticos y que el modelo neutral sea predominante y por ello las variables de suelo y espaciales no explicaron un mayor porcentaje de variación. Para poner a prueba esta segunda hipótesis se evaluó el ajuste de la composición de las comunidades a la distribución ZSM predicha por el modelo neutral y a distribuciones correspondientes a modelos no neutrales. Los resultados indicaron un mejor ajuste de los datos a las distribuciones Zipf y Mandelbrot. Se descarta de esta forma la importancia de dinámicas neutrales en el patrón de las comunidades microbianas de suelos de la Región Pampeana.

En resumen, en este capítulo evaluamos la contribución de efectos actuales e históricos sobre el patrón biogeográfico de las comunidades microbianas de los suelos de la Región Pampeana. Se observó que a nivel regional los factores históricos representados por variables espaciales fueron los más influyentes, mientras que al disminuir la escala espacial (menores distancias), los efectos contemporáneos de las variables ambientales se hicieron evidentes. Además los efectos de las variables de suelo fueron más importantes al disminuir el nivel de precipitaciones. También, descartamos las dinámicas neutrales como importantes moldeadoras de la diversidad

a nivel regional. Finalmente concluimos que el modelo que mejor explica las dinámicas de determinación de la diversidad en las comunidades microbianas a nivel regional estará entre el paradigma de *efecto masa* y de *dinámica de parches.* Si bien no podemos distinguir entre ambos paradigmas, nos inclinamos por el modelo de *efecto masa*, ya que la *dinámica de parches* asume cierta homogeneidad de hábitat que no es observada para la Región Pampeana, principalmente por el efecto de los usos del suelo. Los efectos de las variables ambientales fueron identificados para las comunidades de suelos de la región, en este capítulo y los anteriores, sin embargo, a una escala de análisis regional, estos quedan enmascarados por los efectos históricos relacionados con variables espaciales. Como ya han observado otros autores[91], concluimos que ambos tipos de procesos, los actuales y los históricos, son importantes en la generación de la diversidad de las comunidades microbianas estudiadas. Se necesitarán de todos modos, nuevos estudios que determinen mayor cantidad de variables del sistema para descartar una subestimación de los procesos contemporáneos en los análisis de partición de variación.

CONCLUSIONES

Este trabajo de tesis describe por primera vez, y en contexto del proyecto *Soilgene* y del *Pampa Dataset*, los patrones de diversidad taxonómica y funcional de comunidades microbianas de suelos de de la Región Pampeana utilizando tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Los resultados del proyecto marco *Soilgene* ya han sido presentados en publicaciones y disertaciones [139, 144, 249, 250]; sin embargo, este es el primer trabajo que se basó en un enfoque ecológico más profundo para el análisis de datos de comunidades bacterianas. No solo se describió y comparó la biodiversidad de las comunidades, sino que se indagó en los procesos de generación de esta diversidad.

La primer parte del Capítulo I comparó la estructura y composición taxonómica de comunidades de suelos con y sin historia de manejo agrícola. Se evaluaron así los efectos de más de cien años de agricultura sobre los microorganismos de suelos de la Pampa Ondulada. Se observaron diferencias en el patrón y composición taxonómica entre ambos tipos de suelo. El cambio en la estructura de los ensamblajes microbianos se vio principalmente al nivel de las abundancias de OTUs, en coincidencia con la hipótesis de Baas-Becking que dice que "Todo está en todos lados pero el ambiente selecciona". Las abundancias de taxa en suelos del mismo sitio pero bajo distintas condiciones ambientales debidas al uso agrícola fueron diferentes. Esto corrobora nuestra hipótesis de trabajo. También se observaron correlaciones de las variables ambientales medidas, destacándose el efecto de la materia orgánica y el nivel de nitratos, con la diversidad beta entre suelos con y sin historia de manejo. Las diferencias observadas en la composición taxonómica sugieren una selección de estrategias-r o copiotróficas por parte de los microorganismos en suelos con manejo agrícola, posiblemente debida a la presencia de residuos vegetales lábiles y la fertilización nitrogenada. Por otro lado, se observó mayor abundancia de organismos con estrategias- K u oligotróficos en suelos sin historia de cultivo, donde los nutrientes se encuentran en formas más recalcitrantes.

En la segunda parte del Capítulo I evaluamos las diferencias en los perfiles metagenómicos de suelos con y sin historia de manejo. Vimos que los resultados acompañan a las observaciones del la Parte A. Las diferencias a nivel global de los perfiles metabólicos correlacionan con el patrón de diversidad beta antes observado para las comunidades microbianas de los mismos sitios. A nivel puntual observamos que los metabolismos más representados en los suelos con historia de manejo agrícola estuvieron relacionados con la utilización de nitrógeno, metabolismo central de carbono y de regulación rápida y versátil, mientras que los metagenomas de suelos sin historia de manejo presentaron mayor abundancia de enzimas relacionadas con

regulación de estados de hambreado y de almacenamiento de carbono y energía. Estas diferencias en las funciones metabólicas de los genomas presentes en uno y otro caso dan cuenta de las adaptaciones a una mayor heterogeneidad y disponibilidad de nutrientes en el caso de las comunidades de suelos agronómicos, y una mayor adaptación a ambientes estables y más oligotróficos en el caso de suelos sin historia de uso agrícola.

En el segundo capítulo se evaluaron las diferencias en los efectos de distintos tipos de labranza sobre comunidades de suelos agrícolas. Los resultados permitieron resaltar la importancia de la estructura del suelo y las formas de la materia orgánica sobre las comunidades de microorganismos. Hipotetizamos, frente a las observaciones obtenidas, que las condiciones de agregación del suelo y los menores niveles de materia orgánica presentes en suelos bajo labranza convencional favorecen el establecimiento de comunidades aún más disimiles a las de los suelos sin historia agrícola. Los perfiles metabólicos de las comunidades de suelos bajo labranza convencional son más concordantes con un estilo de vida más copiotrófico; mientras que las comunidades de suelos bajo siembra directa presentaron características de adaptación a suelos más estables con mayor cantidad de macroagregados y de materia orgánica recalcitrante.

Los primeros dos capítulos se enfocaron en los efectos locales de las variables ambientales (i.e. características de suelo variables según el uso agrícola). Los resultados acompañan la hipótesis de Baas-Becking que dice que los microorganismos están universalmente distribuidos y es el ambiente quien selecciona. Sin embargo al cambiar la escala de análisis, los resultados no fueron tan concordantes con esta hipótesis. En el Capítulo III se estudió la contribución de efectos actuales e históricos sobre el patrón biogeográfico de las comunidades microbianas. Se observó que a nivel regional los factores históricos representados por variables espaciales fueron los más influyentes que los factores ambientales. Al disminuir la escala espacial (menores distancias), los efectos contemporáneos de las variables ambientales se hicieron evidentes. A nivel regional el efecto de las precipitaciones fue importante. Se observó correlación del patrón de lluvias con el patrón de diversidad beta. Además los efectos de las variables de suelo fueron más evidentes al disminuir el nivel de precipitaciones en análisis a escalas menores. Descartamos a las dinámicas neutrales, basadas en la equivalencia ecológica de las especies y en la naturaleza estocástica de los procesos demográficos, como las explicativas de los patrones observados. Vimos que el modelo que mejor explicó las dinámicas de determinación de la diversidad en las comunidades microbianas a nivel

regional estaría entre el paradigma de *efecto masa* y de *dinámica de parches.* Los efectos de las variables ambientales y del uso agrícola, fueron identificados, en este capítulo y los anteriores, sin embargo a escala regional fueron enmascarados por los efectos históricos/ demográficos relacionados con las variables espaciales. Concluimos, entonces, que ambos tipos de procesos, los actuales y los históricos, son importantes en la generación de la diversidad de las comunidades microbianas de suelos de la Región Pampeana.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis constituyen una muy importante contribución al conocimiento de los ecosistemas agrícolas de la Región Pampeana. Como se mencionó en la introducción, el entendimiento de los procesos ecológicos y biológicos que mantienen el funcionamiento del suelo como ecosistema es fundamental para poder realizar un uso sustentable del mismo. Son varios los autores que hacen hincapié en esta necesidad de comprensión de los sistemas biológicos [125, 126, 130]. Sobre todo están priorizando los enfoques ecológicos para el análisis de suelos. Fierer y colaboradores propusieron la utilización de modelos espaciales de distribución de especies basados en propiedades de nicho [183]. En el reciente trabajo proponen la reconstrucción de la distribución de especies del ecosistema original basándose en información metagenómica de sitios sin historia de modificaciones agrícolas en las llanuras del centro de Estados Unidos. Obteniéndose este modelo, se puede luego cuantificar el nivel de modificación que sufrieron las comunidades de suelos bajo manejo agrícola respecto de su hipotético estado original pre-agrícola. Como perspectivas a futuro, proponemos implementar este tipo de modelos para la Región Pampeana. En base a nuestros resultados deberá apuntarse a generar modelos que incluyan, además, información sobre las distancias geográficas y/o variables demográficas además de las variables ambientales o de nicho. Estos modelos podrán luego utilizarse para planes de conservación y restauración de suelos y para tomar medidas y políticas de prevención y de manejo concordantes con un uso agrícola sustentable.

ANEXO

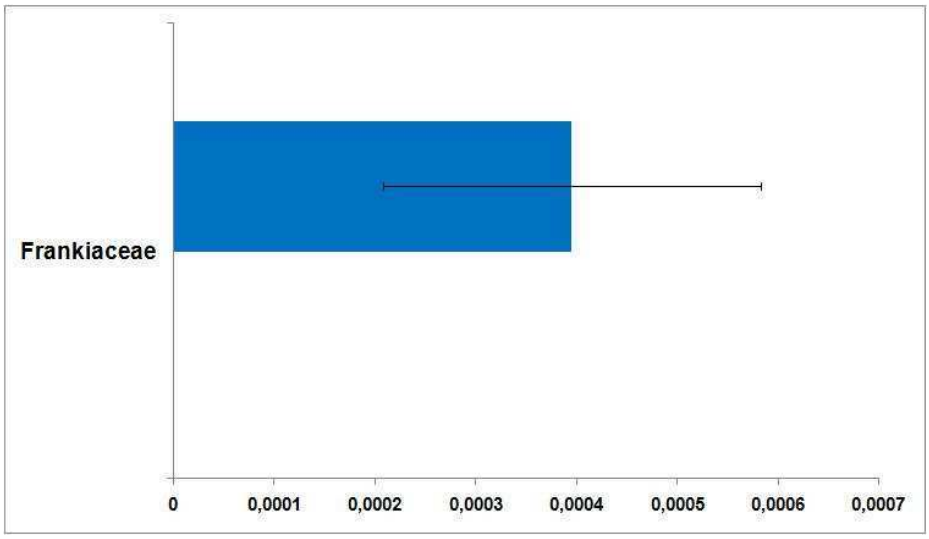


***Figura A1*: Promedio de las abundancias relativas de miembros de la familia *Frankiaceae* en las comunidades de suelos Agro (Rojo) y No Agro (Azul). Las barras indican ± 1 desvío estándar.**

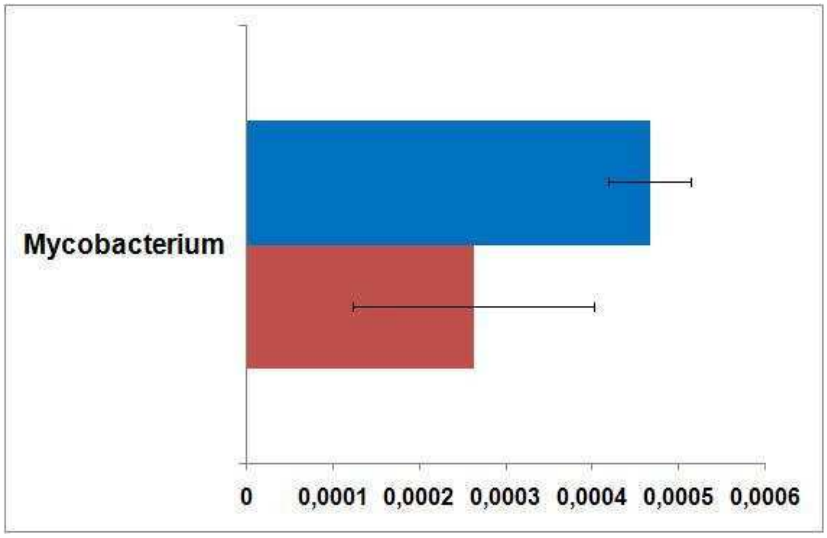


***Figura A2*: Promedio de las abundancias relativas de miembros del género *Mycobacterium* en las comunidades de suelos Agro (Rojo) y No Agro (Azul). Las barras indican ± 1 desvío estándar.**

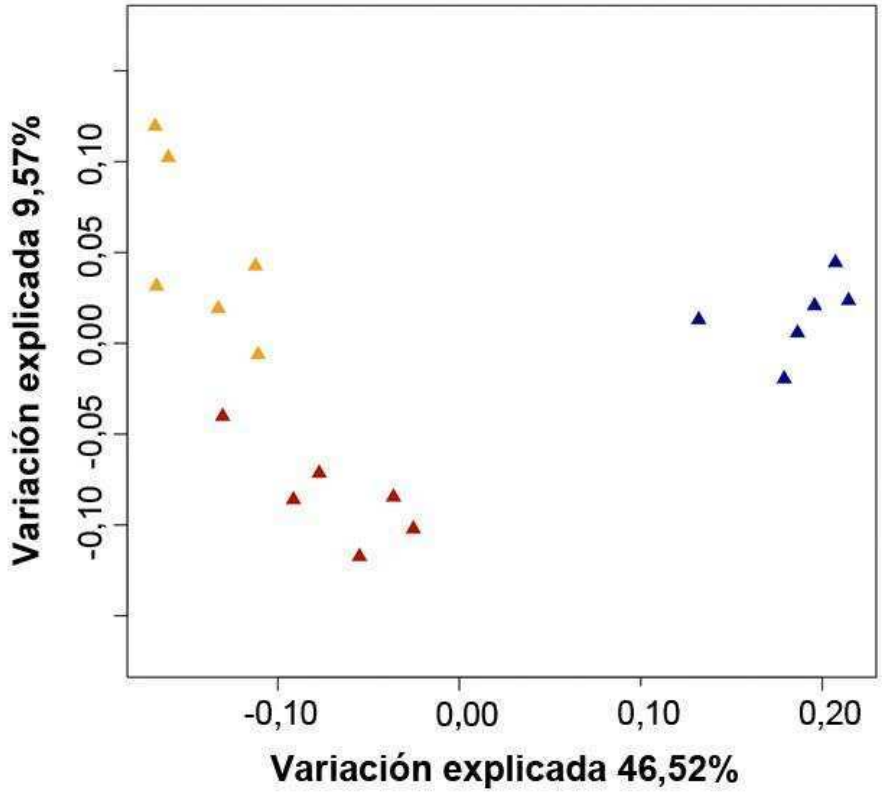


***Figura A3*: Patrón de diversidad beta basado en weighted Unifrac de las comunidades de suelos bajo SD (Rojo), bajo CT (Naranja) y de suelos sin historia de manejo en el experimento de Balcarce.**

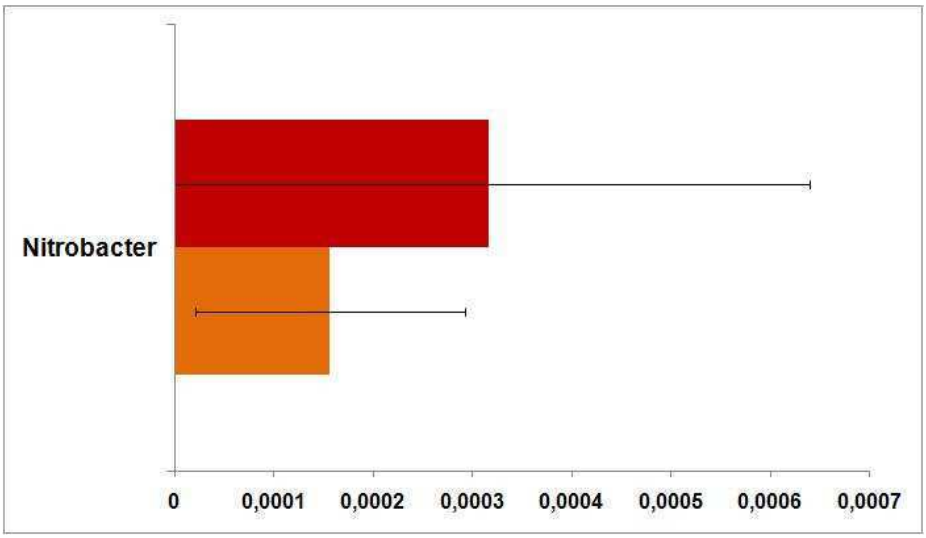


***Figura A4*: Promedio de las abundancias relativas de miembros del género *Nitrobacter* en las comunidades de suelos bajo SD (Rojo) y LC (Naranja) del experimento de Balcarce. Las barras indican ± 1 desvío estándar.**

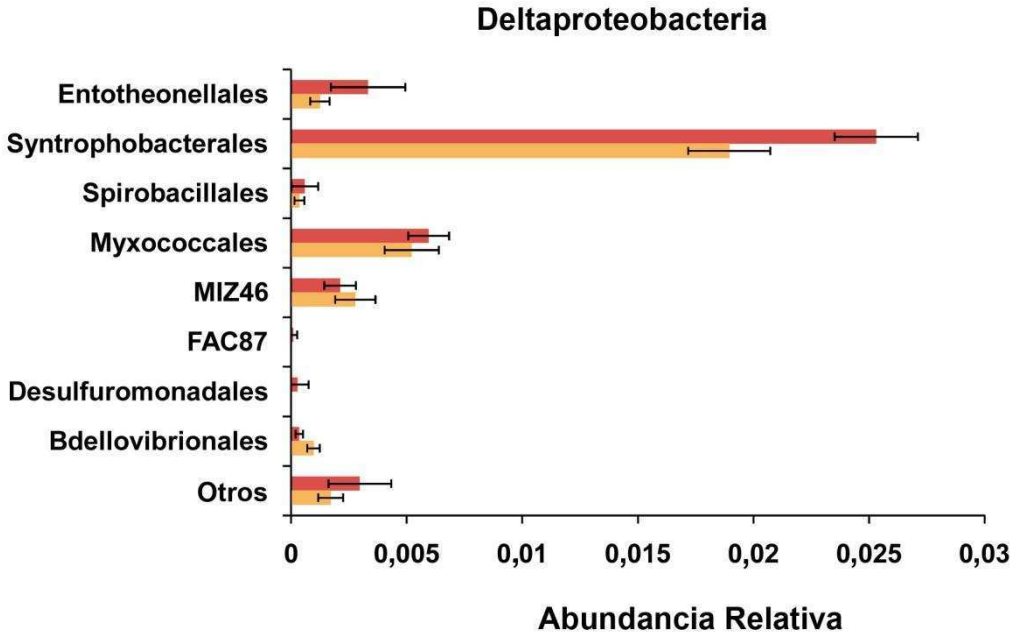


***Figura A5*: Promedio de las abundancias relativas de miembros de la clase *Deltaproteobacteria* en las comunidades de suelos bajo SD (Rojo) y LC (Naranja) del experimento de Balcarce. Las barras indican ± 1 desvío estándar.**

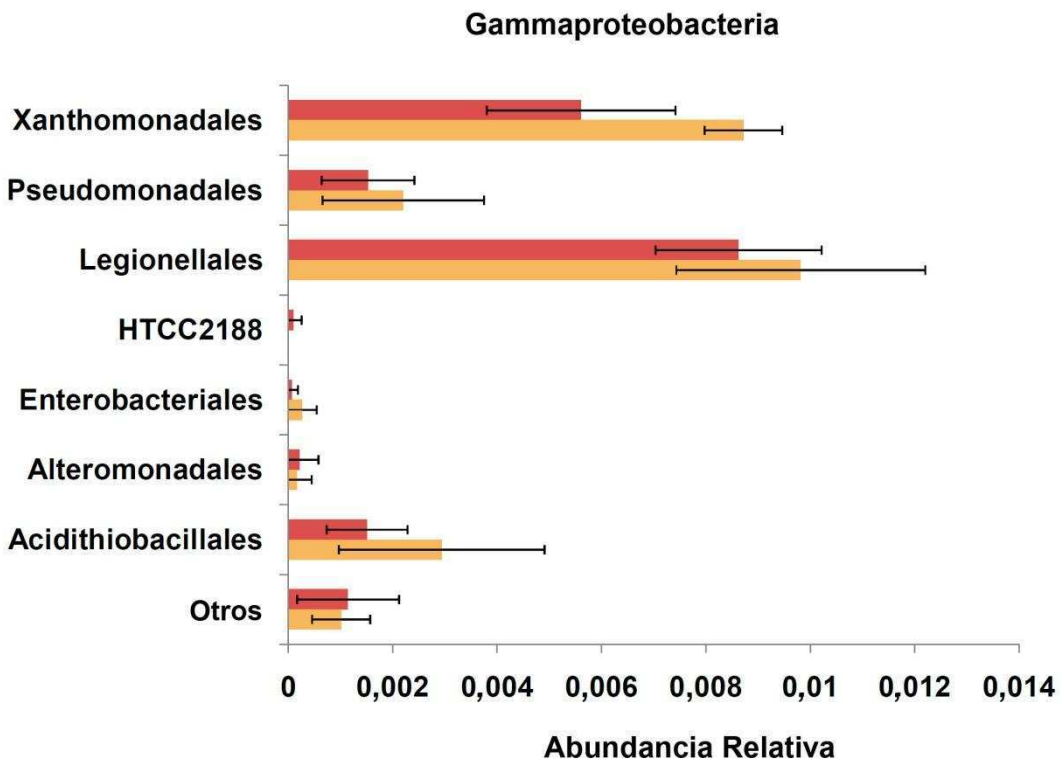


***Figura A6*: Promedio de las abundancias relativas de miembros de la clase *Gammaproteobacteria* en las comunidades de suelos bajo SD (Rojo) y LC (Naranja) del experimento de Balcarce. Las barras indican ± 1 desvío estándar.**

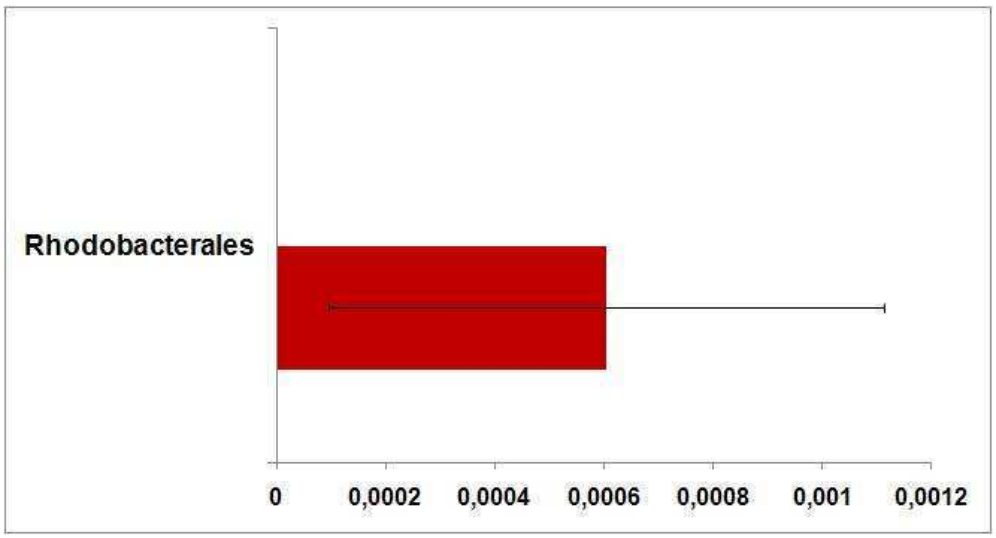


***Figura A7*: Promedio de las abundancias relativas de miembros del orden *Rhodobacterales* en las comunidades de suelos bajo SD (Rojo) y LC (Naranja) del experimento de Balcarce. Las barras indican ± 1 desvío estándar.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Needelman, B.A., *What Are Soils?* Nature Education Knowledge, 2013. **4**(3): p. 2.
2. Haygarth, P.M. and K. Ritz, *The future of soils and land use in the UK: Soil systems for the provision of land-based ecosystem services.* Land Use Policy, 2009. **26, Supplement 1**(0): p. S187-S197.
3. Kassam, A. and T. Friedrich, *Conservation Agriculture: Principles, Sustainable Land Management and Ecosystem Services*. 2011: Società Italiana de Agronomia XL Convegno Nazionale, Università degli Studi Teramo.
4. Paul, E.A. and F.E. Clark, *Soil microbiology and biochemistry*. 1989: Academic Press.
5. Torsvik, V. and L. Øvreås, *Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems.* Current Opinion in Microbiology, 2002. **5**(3): p. 240-245.
6. Torsvik, V., et al., *Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments.* Journal of Biotechnology, 1998. **64**(1): p. 53-62.
7. Six, J., et al., *A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics.* Soil and Tillage Research, 2004. **79**(1): p. 7-31.
8. Hassink, J., et al., *Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grassland soils.* Soil Biology and Biochemistry, 1993. **25**(1): p. 47-55.
9. Foster, R.C., *Microenvironments of soil microorganisms.* Biology and Fertility of Soils, 1988. **6**(3): p. 189-203.
10. Bardgett, R., *The Biology of Soil: A Community and Ecosystem Approach*. Biology of Habitats. 2005: OUP Oxford.
11. Prosser, J.I., et al., *The role of ecological theory in microbial ecology.* Nat Rev Micro, 2007. **5**(5): p. 384-392.
12. Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer, *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.* Microbiological Reviews, 1995. **59**(1): p. 143-169.
13. Torsvik, V., J. Goksøyr, and F.L. Daae, *High diversity in DNA of soil bacteria.* Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56**(3): p. 782-787.
14. Joseph, S.J., et al., *Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria.* Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(12): p. 7210-7215.
15. Kaeberlein, T., K. Lewis, and S.S. Epstein, *Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment.* Science, 2002. **296**(5570): p. 1127-1129.
16. Zengler, K., et al., *Cultivating the uncultured.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(24): p. 15681-15686.
17. Zhou, J., M.A. Bruns, and J.M. Tiedje, *DNA recovery from soils of diverse composition.* Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(2): p. 316-322.
18. Hurt, R.A., et al., *Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments.* Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(10): p. 4495-4503.
19. Rondon, M.R., R.M. Goodman, and J. Handelsman, *The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity.* Trends in Biotechnology, 1999. **17**(10): p. 403-409.
20. Holben, W.E., et al., *DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community.* Applied and Environmental Microbiology, 1988. **54**(3): p. 703-711.
21. Zhou, J., et al., *Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil.* Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(1): p. 326-334.
22. Dunbar, J., L.O. Ticknor, and C.R. Kuske, *Assessment of Microbial Diversity in Four Southwestern United States Soils by 16S rRNA Gene Terminal Restriction Fragment Analysis.* Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(7): p. 2943-2950.
23. Ward, D.M., R. Weller, and M.M. Bateson, *16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community.* Nature, 1990. **345**(6270): p. 63-65.
24. Woese, C.R., *Bacterial evolution.* Microbiological Reviews, 1987. **51**(2): p. 221-271.

25. Van de Peer, Y., S. Chapelle, and R. De Wachter, *A Quantitative Map of Nucleotide Substitution Rates in Bacterial rRNA.* Nucleic Acids Research, 1996. **24**(17): p. 3381-3391.
26. Yap, W.H., et al., *Genetic diversity of soil microorganisms assessed by analysis ofhsp70 (dnaK) sequences.* Journal of Industrial Microbiology, 1996. **17**(3-4): p. 179-184.
27. Webster, G., T.M. Embley, and J.I. Prosser, *Grassland Management Regimens Reduce Small-Scale Heterogeneity and Species Diversity of β-Proteobacterial Ammonia Oxidizer Populations.* Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(1): p. 20-30.
28. Widmer, F., et al., *Analysis of nifH Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range.* Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(2): p. 374-380.
29. Rondon, M.R., et al., *Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms.* Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(6): p. 2541-2547.
30. Sanger, F., et al., *Nucleotide sequence of bacteriophage [phi]X174 DNA.* Nature, 1977. **265**(5596): p. 687-695.
31. Dunbar, J., et al., *Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils.* Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(6): p. 3035-3045.
32. Green, S. and E. Rubin, *Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples.* Nature Reviews Genetics, 2005. **6**(11): p. 805-814.
33. Avaniss-Aghajani, E., et al., *A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences.* BioTechniques, 1994. **17**(1): p. 144-6, 148-9.
34. Liu, W.T., et al., *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA.* Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(11): p. 4516-4522.
35. Muyzer, G., E.C. de Waal, and A.G. Uitterlinden, *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.* Applied and Environmental Microbiology, 1993. **59**(3): p. 695-700.
36. Kirk, J.L., et al., *Methods of studying soil microbial diversity.* Journal of Microbiological Methods, 2004. **58**(2): p. 169-188.
37. van Elsas, J.D., J.K. Jansson, and J.T. Trevors, *Modern Soil Microbiology, Second Edition*. Books in Soils, Plants, and the Environment. 2006: Taylor & Francis.
38. Daniel, R., *The metagenomics of soil.* Nat Rev Micro, 2005. **3**(6): p. 470-478.
39. Ronaghi, M., et al., *Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release.* Analytical Biochemistry, 1996. **242**(1): p. 84-89.
40. Cardenas, E. and J.M. Tiedje, *New tools for discovering and characterizing microbial diversity.* Current Opinion in Biotechnology, 2008. **19**(6): p. 544-549.
41. Fierer, N., et al., *Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients.* ISME J, 2012. **6**(5): p. 1007-1017.
42. Roesch, L.F.W., et al., *Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity.* ISME J, 2007. **1**(4): p. 283-290.
43. Fulthorpe, R.R., et al., *Distantly sampled soils carry few species in common.* ISME J, 2008. **2**(9): p. 901-910.
44. Margulies, M., et al., *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.* Nature, 2005. **437**(7057): p. 376-380.
45. Shendure, J. and H. Ji, *Next-generation DNA sequencing.* Nat Biotech, 2008. **26**(10): p. 1135-1145.
46. Mardis, E.R., *The impact of next-generation sequencing technology on genetics.* Trends in genetics : TIG, 2008. **24**(3): p. 133-141.
47. Olsen, G.J., et al., *The Ribosomal Database Project.* Nucleic Acids Research, 1992. **20**(suppl): p. 2199-2200.

48. Weinstock, G.M., *Genomic approaches to studying the human microbiota.* Nature, 2012. **489**(7415): p. 250-256.
49. Petrosino, J.F., et al., *Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification.* Clinical Chemistry, 2009. **55**(5): p. 856-866.
50. Doolittle, W.F. and O. Zhaxybayeva, *On the origin of prokaryotic species.* Genome Res, 2009: p. 744–756.
51. Edgar, R.C., *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.* Bioinformatics, 2010. **26**(19): p. 2460-2461.
52. Schloss, P.D., *Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities.* Appl Environ Microbiol, 2009: p. 7537-41.
53. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool.* J. Mol. Biol., 1990: p. 403-410.
54. Wang, Q., et al., *Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy.* Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(16): p. 5261-5267.
55. Wolfgang, L., et al., *ARB: a software environment for sequence data.* Nucleic Acids Research, 2004: p. 1363-1371.
56. Yok, N.G. and G.L. Rosen, *Combining gene prediction methods to improve metagenomic gene annotation.* BMC Bioinformatics, 2011: p. 20.
57. Hoff, K.J., et al., *Orphelia: predicting genes in metagenomic sequencing reads.* Nucleic Acids Res., 2009: p. W101–W105.
58. Noguchi, H., T. Taniguchi, and T. Itoh, *Meta gene annotator: detecting species-specific patterns of ribosomal binding site for precise gene prediction in anonymous prokaryotic and phage genomes.* DNA Res., 2008: p. 387–396.
59. Zhu, W., A. Lomsadze, and M. Borodovsky, *Ab initio gene identification in metagenomic sequences.* Nucleic Acids Res, 2010.
60. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology.The Gene Ontology Consortium.* Nat. Genet., 2000: p. 25–29.
61. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.* Nucleic Acids Res., 2000: p. 27–30.
62. Tatusov, R.L., et al., *The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution.* Nucleic Acids Research, 2000. **28**(1): p. 33-36.
63. Overbeek, R., et al., *The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes.* Nucleic Acids Research, 2005. **33**(17): p. 5691-5702.
64. Markowitz, V.M., et al., *IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes.* Nucleic Acids Res, 2008: p. D534–D538.
65. Meyer, E., et al., *The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes.* BMC Bioinformatics, 2008: p. 386.
66. Sun, S., et al., *Community cyberinfrastructure for advanced microbial ecology research and analysis: the CAMERA resource.* Nucleic Acids Res, 2011: p. D546–D551.
67. Punta, M., et al., *The Pfam protein families database.* Nucl. Acids Res, 2012: p. D290-D301.
68. Vogel, T.M., et al., *TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome.* Nat Rev Microbiol, 2009: p. 2.
69. Jansson, J., *Towards "Tera-Terra": Terabase Sequencing of Terrestrial Metagenomes.* Microbiome, 2011. **6**(7): p. 309-315.
70. Whittaker, R.H., *Evolution and measurement of species diversity.* Taxon, 1972. **21**: p. 213–251.

71. Kindt, R. and R. Coe, *Tree Diversity Analysis: A Manual and Software for Common Statistical Methods for Ecological and Biodiversity Studies*. 2005: World Agrofirestry Centre.
72. Lomolino, M.V., *Biogeography*. 2010: Sinauer Associates, Incorporated.
73. Øvreås, L., *Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments.* Ecology Letters, 2000. **3**(3): p. 236-251.
74. Dolan, J.R., *Microbial biogeography?* Journal of Biogeography, 2006. **33**(2): p. 199-200.
75. van der Gast, C., *MICROBIAL BIOGEOGRAPHY AND WHAT BAAS BECKING SHOULD HAVE SAID*, in *Microbiology Today*. 2013, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY
76. Martiny, J.B.H., et al., *Microbial biogeography: putting microorganisms on the map.* Nat Rev Micro, 2006. **4**(2): p. 102-112.
77. Becking, L.G.M.B., *Geobiologie, of Inleiding Tot de Milieukunde: Met Literatuurlijst en Ind*. Wetenschappelijke Serie. 1934: Van Stockum.
78. Falush, D., et al., *Traces of Human Migrations in Helicobacter pylori Populations.* Science, 2003. **299**(5612): p. 1582-1585.
79. Bala, A., P. Murphy, and K.E. Giller, *Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics.* Molecular Ecology, 2003. **12**(4): p. 917-929.
80. Zhang, N. and M. Blackwell, *Population Structure of Dogwood Anthracnose Fungus.* Phytopathology, 2002. **92**(12): p. 1276-1283.
81. Cho, J.-C. and J.M. Tiedje, *Biogeography and Degree of Endemicity of Fluorescent Pseudomonas Strains in Soil.* Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(12): p. 5448-5456.
82. Glaeser, J. and J. Overmann, *Biogeography, Evolution, and Diversity of Epibionts in Phototrophic Consortia.* Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(8): p. 4821-4830.
83. Buckley, D.H. and T.M. Schmidt, *Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems.* Environmental Microbiology, 2003. **5**(6): p. 441-452.
84. Franklin, R.B. and A.L. Mills, *Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field.* FEMS Microbiology Ecology, 2003. **44**(3): p. 335-346.
85. Fierer, N. and R.B. Jackson, *The diversity and biogeography of soil bacterial communities.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(3): p. 626-631.
86. Yergeau, E., et al., *Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats.* Environmental Microbiology, 2007. **9**(11): p. 2670-2682.
87. Reche, I., et al., *DOES ECOSYSTEM SIZE DETERMINE AQUATIC BACTERIAL RICHNESS?* Ecology, 2005. **86**(7): p. 1715-1722.
88. Declerck, S.A.J., et al., *Effects of patch connectivity and heterogeneity on metacommunity structure of planktonic bacteria and viruses.* ISME J, 2013. **7**(3): p. 533-542.
89. Dumbrell, A.J., et al., *Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community.* ISME J, 2009. **4**(3): p. 337-345.
90. Sokol, E.R., et al., *Local and regional influences over soil microbial metacommunities in the Transantarctic Mountains.* Ecosphere, 2013. **4**(11): p. art136.
91. Hanson, C.A., et al., *Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape.* Nat Rev Micro, 2012. **10**(7): p. 497-506.
92. Hanski, I. and M. Gilpin, *Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain.* Biological Journal of the Linnean Society, 1991. **42**(1-2): p. 3-16.
93. Leibold, M.A., et al., *The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology.* Ecology Letters, 2004. **7**(7): p. 601-613.

94. Logue, J.B., et al., *Empirical approaches to metacommunities: a review and comparison with theory.* Trends in Ecology & Evolution, 2011. **26**(9): p. 482-491.
95. Hubbell, S.P., *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography (MPB-32)*. Monographs in Population Biology. 2011: Princeton University Press.
96. Leibold, M., *Similarity and local co-existence of species in regional biotas.* Evolutionary Ecology, 1998. **12**(1): p. 95-110.
97. Nicolas Mouquet and Michel Loreau, *Coexistence in Metacommunities: The Regional Similarity Hypothesis.* The American Naturalist, 2002. **159**(4): p. 420-426.
98. Mouquet, N., et al., *Community assembly time and the relationship between local and regional species richness.* Oikos 2003. **103**: p. 618-626.
99. Cadotte, M.W., *COMPETITION–COLONIZATION TRADE-OFFS AND DISTURBANCE EFFECTS AT MULTIPLE SCALES.* Ecology, 2007. **88**(4): p. 823-829.
100. Winegardner, A.K., et al., *The terminology of metacommunity ecology.* Trends in Ecology & Evolution, 2012. **27**(5): p. 253-254.
101. Logue, J.B. and E.S. Lindstrom, *Species sorting affects bacterioplankton community composition as determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints.* ISME J, 2010. **4**(6): p. 729-738.
102. Langenheder, S. and A.J. Szekely, *Species sorting and neutral processes are both important during the initial assembly of bacterial communities.* ISME J, 2011. **5**(7): p. 1086-1094.
103. Logares, R., et al., *Biogeography of bacterial communities exposed to progressive long-term environmental change.* ISME J, 2013. **7**(5): p. 937-948.
104. Lindström, E.S. and Ö. Östman, *The Importance of Dispersal for Bacterial Community Composition and Functioning.* PLoS ONE, 2011. **6**(10): p. e25883.
105. Leibold, M.A. and M.A. McPeek, *Coexistence of the Niche and Neutral Perspectives in Community Ecology.* Ecology, 2006. **87**(6): p. 1399-1410.
106. Macarthur, R. and R. Levins, *The Limiting Similarity, Convergence, and Divergence of Coexisting Species.* The American Naturalist, 1967. **101**(921): p. 377-385.
107. Diaz, S., M. Cabido, and F. Casanoves, *Plant functional traits and environmental filters at a regional scale.* Journal of Vegetation Science, 1998. **9**(1): p. 113-122.
108. Kowalchuk, G.A. and J.R. Stephen, *AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA: A Model for Molecular Microbial Ecology.* Annual Review of Microbiology, 2001. **55**(1): p. 485-529.
109. Leininger, S., et al., *Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils.* Nature, 2006. **442**(7104): p. 806-809.
110. Prosser, J.I., *Autotrophic nitrification in bacteria.* Adv Microb Physiol, 1989. **30**: p. 125–181.
111. Orso, S., et al., *Molecular Phylogenetic Analysis of Nitrobacter spp.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1994. **44**(1): p. 83-86.
112. Teske, A., et al., *Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria.* Journal of Bacteriology, 1994. **176**(21): p. 6623-6630.
113. Koops, H.-P. and A. Pommerening-Röser, *Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species.* FEMS Microbiology Ecology, 2001. **37**(1): p. 1-9.
114. Cleveland, C.C., et al., *Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N2) fixation in natural ecosystems.* Global Biogeochemical Cycles, 1999. **13**(2): p. 623-645.
115. Benson, D.R. and W.B. Silvester, *Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants.* Microbiological Reviews, 1993. **57**(2): p. 293-319.
116. van Rhijn, P. and J. Vanderleyden, *The Rhizobium-plant symbiosis.* Microbiological Reviews, 1995. **59**(1): p. 124-142.
117. Newbould, P., A.J. Holding, and J.V. Lake, *Biological Nitrogen Fixation in Upland and Marginal Areas of the U.K [and Discussion].* Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences, 1982. **296**(1082): p. 405-417.

118. Herridge, D., M. Peoples, and R. Boddey, *Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems.* Plant and Soil, 2008. **311**(1-2): p. 1-18.
119. Jonasson, S., A. Michelsen, and I.K. Schmidt, *Coupling of nutrient cycling and carbon dynamics in the Arctic, integration of soil microbial and plant processes.* Applied Soil Ecology, 1999. **11**(2–3): p. 135-146.
120. Houghton, R., *Counting terrestrial sources and sinks of carbon.* Climatic Change, 2001: p. 525-534
121. Paruelo, J.M., et al., *Cambios en el uso de la tierra en Argentina y Uruguay: marcos conceptuales para su analisis.* Agrociencia, 2006: p. 47-61.
122. Guerschman, J.P. and J.M. Paruelo, *Agricultural impacts on ecosystem functioning in temperate areas of North and South America.* Global and Planetary Change, 2005: p. 170-180.
123. Smith, P., et al., *How much land-based greenhouse gas mitigation can be achieved without compromising food security and environmental goals?* Global Change Biology, 2013. **19**(8): p. 2285-2302.
124. Bennett, E.M., S.R. Carpenter, and N.F. Caraco, *Human Impact on Erodable Phosphorus and Eutrophication: A Global Perspective: Increasing accumulation of phosphorus in soil threatens rivers, lakes, and coastal oceans with eutrophication.* BioScience, 2001. **51**(3): p. 227-234.
125. Scholes, M.C. and R.J. Scholes, *Dust Unto Dust.* Science, 2013. **342**(6158): p. 565-566.
126. Foley, J.A., et al., *Solutions for a cultivated planet.* Nature, 2011. **478**(7369): p. 337-42.
127. Tilman, D., et al., *Global food demand and the sustainable intensification of agriculture.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(50): p. 20260-4.
128. Power, A.G., *Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1554): p. 2959-71.
129. Foley, J.A., et al., *Global consequences of land use.* Science, 2005. **309**(5734): p. 570-4.
130. Cardinale, B.J., et al., *Biodiversity loss and its impact on humanity.* Nature, 2012. **486**(7401): p. 59-67.
131. Giller, K.E., et al., *Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function.* Applied Soil Ecology, 1997. **6**(1): p. 3-16.
132. Casas, R., *Sustentabilidad de la agricultura en la región pampeana.* http://www.inta.gov.ar/, 2003.
133. Manuel-Navarrete, D., et al., *Multi-causal and integrated assessment of sustainability: the case of agriculturization in the Argentine Pampas.* Environment, Development and Sustainability, 2009. **11**(3): p. 621-638.
134. Hall, A.J., et al., *Field crop systems of the Pampas*, in *Field Crop Ecosystems of the World*, C.J. Pearson, Editor. 1992, Elsevier Science & Technology Books: Amsterdam. p. 413–450.
135. Alvarez, R., et al., *Soil organic carbon, microbial biomass and CO2-C production from three tillage systems.* Soil and Tillage Research, 1995. **33**(1): p. 17-28.
136. Alvarez, R., *Estimation of carbon losses by cultivation from soils of the Argentine Pampa using the Century Model.* Soil Use and Management, 2001. **17**(2): p. 62-66.
137. Bernardos, J.N., et al., *The use of EPIC model to study the agroecological change during 93 years of farming transformation in the Argentine pampas.* Agricultural Systems, 2001. **69**(3): p. 215-234.
138. Hevia, G.G., et al., *Organic matter in size fractions of soils of the semiarid Argentina. Effects of climate, soil texture and management.* Geoderma, 2003. **116**(3–4): p. 265-277.
139. Berhongaray, G., et al., *Land use effects on soil carbon in the Argentine Pampas.* Geoderma, 2013. **192**(0): p. 97-110.

140. Alvarez, R. and H.S. Steinbach, *A review of the effects of tillage systems on some soil physical properties, water content, nitrate availability and crops yield in the Argentine Pampas.* Soil and Tillage Research, 2009. **104**(1): p. 1-15.
141. Derpsch, R., *Global Overview of Conservation Agriculture Adoption*. 2009: http://www.fao.org/.
142. Shade, A., et al., *Can the black box be cracked[quest] The augmentation of microbial ecology by high-resolution, automated sensing technologies.* ISME J, 2009. **3**(8): p. 881-888.
143. Bodelier, P., *Towards understanding, managing and protecting microbial ecosystems.* Frontiers in Microbiology, 2011. **2**.
144. Rascovan, N., et al., *The PAMPA datasets: a metagenomic survey of microbial communities in Argentinean pampean soils.* Microbiome, 2013. **1**(1): p. 21.
145. Barsky, O. and S. Bearzotti, *El Desarrollo agropecuario pampeano*. Colección Estudios políticos y sociales. 1991: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.
146. Lavado, R.S., *La Región Pampeana: historia, características y uso de sus suelos*, in *Materia Orgánica. Valor agronómico y dinámica en suelos pampeanos*, R. Alvarez, Editor. 2008, Editorial Facultad de Ingenieria: Buenos Aires. p. 1-11.
147. Gee, G.W. and J.W.E.K.A. Bauder, *Particle-size Analysis*, in *Methods of Soil Analysis: Part 1—Physical and Mineralogical Methods*. 1986, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. p. 383-411.
148. Nelson, D.W., et al., *Total Carbon, Organic Carbon, and Organic Matter*, in *Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical Methods*. 1996, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. p. 961-1010.
149. Rhoades, J.D.E., et al., *Salinity: Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids*, in *Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical Methods*. 1996, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. p. 417-435.
150. Kuo, S.E., et al., *Phosphorus*, in *Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical Methods*. 1996, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. p. 869-919.
151. Bremner, J.M.E., et al., *Nitrogen-Total*, in *Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical Methods*. 1996, Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. p. 1085-1121.
152. Caporaso, J.G., et al., *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.* Nat Meth, 2010. **7**(5): p. 335-336.
153. Quince, C., et al., *Removing noise from pyrosequenced amplicons.* BMC Bioinformatics, 2011: p. 38.
154. Caporaso, J.G., et al., *PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment.* Bioinformatics, 2010. **26**(2): p. 266-267.
155. Price, M.N., P.S. Dehal, and A.P. Arkin, *FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix.* Molecular Biology and Evolution, 2009. **26**(7): p. 1641-1650.
156. Lozupone, C. and R. Knight, *UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities.* Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(12): p. 8228-8235.
157. Lozupone, C.A., et al., *Quantitative and Qualitative β Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities.* Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(5): p. 1576-1585.
158. DeSantis, T.Z., et al., *Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB.* Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(7): p. 5069-5072.
159. De Wit, R. and T. Bouvier, *'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say?* Environmental Microbiology, 2006. **8**(4): p. 755-758.

160. Pedrós-Alió, C., *Dipping into the Rare Biosphere.* Science, 2007. **315**(5809): p. 192-193.
161. Pedrós-Alió, C., *Marine microbial diversity: can it be determined?* Trends in microbiology, 2006. **14**(6): p. 257-263.
162. Fierer, N., M.A. Bradford, and R.B. Jackson, *Toward an ecological classification of soil bacteria.* Ecology, 2007. **88**(6): p. 1354-1364.
163. Dion, P. and C.S. Nautiyal, *Microbiology of Extreme Soils*. Soil Biology. 2008: Springer.
164. Galantini, J. and R. Rosell, *Long-term fertilization effects on soil organic matter quality and dynamics under different production systems in semiarid Pampean soils.* Soil and Tillage Research, 2006. **87**(1): p. 72-79.
165. Rocha, U., et al., *Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the Verrucomicrobia subdivision 1 from the potato (Solanum tuberosum L.) rhizosphere.* Journal of Soils and Sediments, 2010. **10**(2): p. 326-339.
166. Senechkin, I., et al., *Isolation and Partial Characterization of Bacterial Strains on Low Organic Carbon Medium from Soils Fertilized with Different Organic Amendments.* Microbial Ecology, 2010. **60**(4): p. 829-839.
167. Ramirez, K.S., J.M. Craine, and N. Fierer, *Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes.* Global Change Biology, 2012. **18**(6): p. 1918-1927.
168. Lauro, F.M., et al., *The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(37): p. 15527-15533.
169. Lage, O.M. and J. Bondoso, *Bringing Planctomycetes into pure culture.* Frontiers in Microbiology, 2012. **3**.
170. DeBruyn, J.M., et al., *Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil.* Applied and Environmental Microbiology, 2011. **77**(17): p. 6295-6300.
171. Nemergut, D.R., et al., *The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling.* Environmental Microbiology, 2008. **10**(11): p. 3093-3105.
172. Fawaz, M.N., *Revealing the Ecological Role of Gemmatimonadetes Through Cultivation and Molecular Analysis of Agricultural Soils*. 2013, University of Tennessee.
173. Zhang, H., et al., *Gemmatimonas aurantiaca gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003. **53**(4): p. 1155-1163.
174. DeBruyn, J.M., et al., *Gemmatirosa kalamazoonesis gen. nov., sp. nov., a member of the rarely-cultivated bacterial phylum Gemmatimonadetes.* The Journal of General and Applied Microbiology, 2013. **59**(4): p. 305-312.
175. Attard, E., et al., *Shifts between Nitrospira- and Nitrobacter-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices.* Environmental Microbiology, 2010. **12**(2): p. 315-326.
176. Blackburne, R., et al., *Kinetic characterisation of an enriched Nitrospira culture with comparison to Nitrobacter.* Water Research, 2007. **41**(14): p. 3033-3042.
177. Maixner, F., et al., *Nitrite concentration influences the population structure of Nitrospira-like bacteria.* Environmental Microbiology, 2006. **8**(8): p. 1487-1495.
178. Vos, M., et al., *Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil.* FEMS Microbiology Reviews, 2013. **37**(6): p. 936-954.
179. Meyer, F., et al., *The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes.* BMC Bioinformatics, 2008. **9**(1): p. 386.
180. Clarke, K.R., *Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure.* Australian Journal of Ecology, 1993. **18**(1): p. 117-143.

181. Anderson, M.J., *A new method for non-parametric multivariate analysis of variance.* Austral Ecology, 2001. **26**(1): p. 32-46.
182. R Core Team, *A Language and Environment for Statistical Computing*. 2013, R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
183. Fierer, N., et al., *Reconstructing the Microbial Diversity and Function of Pre-Agricultural Tallgrass Prairie Soils in the United States.* Science, 2013. **342**(6158): p. 621-624.
184. Edwards, A.L., et al., *Structural basis for recognition of S-adenosylhomocysteine by riboswitches.* RNA, 2010. **16**(11): p. 2144-2155.
185. Loenen, W.A., *S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything?* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 2): p. 330-3.
186. Winkler, W.C. and R.R. Breaker, *Regulation of bacterial gene expression by riboswitches.* Annual Review of Microbiology, 2005. **59**(1): p. 487-517.
187. Nudler, E. and A.S. Mironov, *The riboswitch control of bacterial metabolism.* Trends in biochemical sciences, 2004. **29**(1): p. 11-17.
188. Roszak, D.B. and R.R. Colwell, *Survival strategies of bacteria in the natural environment.* Microbiological Reviews, 1987. **51**(3): p. 365-379.
189. Stępkowski, T., et al., *Bayesian phylogenetic analysis reveals two-domain topology of S-adenosylhomocysteine hydrolase protein sequences.* Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005. **34**(1): p. 15-28.
190. Rusch, D.B., et al., *The <italic>Sorcerer II</italic> Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific.* PLoS Biol, 2007. **5**(3): p. e77.
191. Gianoulis, T.A., et al., *Quantifying environmental adaptation of metabolic pathways in metagenomics.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(5): p. 1374-1379.
192. Sañudo-Wilhelmy, S.A., et al., *Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012.
193. Yan, D., *Protection of the glutamate pool concentration in enteric bacteria.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(22): p. 9475-9480.
194. Prusiner, S.B., R. Stadtman, and S. American Chemical, *The Enzymes of glutamine metabolism*. Academic Press Rapid Manuscript Reproduction. 1973: Academic Press.
195. Ikeda, T.P., A.E. Shauger, and S. Kustu, *Salmonella typhimuriumApparently Perceives External Nitrogen Limitation as Internal Glutamine Limitation.* Journal of Molecular Biology, 1996. **259**(4): p. 589-607.
196. Doucette, C.D., et al., *α-ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition.* Nat Chem Biol, 2011. **7**(12): p. 894-901.
197. Cai, L. and B.P. Tu, *On Acetyl-CoA as a Gauge of Cellular Metabolic State.* Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2011. **76**: p. 195-202.
198. Rock, C.O., H.-W. Park, and S. Jackowski, *Role of Feedback Regulation of Pantothenate Kinase (CoaA) in Control of Coenzyme A Levels in Escherichia coli.* Journal of Bacteriology, 2003. **185**(11): p. 3410-3415.
199. Leonardi, R., et al., *Pantothenate Kinase 1 Is Required to Support the Metabolic Transition from the Fed to the Fasted State.* PLoS ONE, 2010. **5**(6): p. e11107.
200. Kumari, S., et al., *Regulation of Acetyl Coenzyme A Synthetase inEscherichia coli.* Journal of Bacteriology, 2000. **182**(15): p. 4173-4179.
201. Elbein, A.D., et al., *New insights on trehalose: a multifunctional molecule.* Glycobiology, 2003. **13**(4): p. 17R-27R.
202. Wolf, A., R. Krämer, and S. Morbach, *Three pathways for trehalose metabolism in Corynebacterium glutamicum ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress.* Molecular microbiology, 2003. **49**(4): p. 1119-1134.
203. Barabote, R.D., et al., *Complete genome of the cellulolytic thermophile Acidothermus cellulolyticus 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations.* Genome Research, 2009. **19**(6): p. 1033-1043.

204. Lopez, M.F., M.S. Fontaine, and J.G. Torrey, *Levels of trehalose and glycogen in Frankia sp. HFPArI3 (Actinomycetales).* Canadian Journal of Microbiology, 1984. **30**(6): p. 746-752.
205. Tropis, M., et al., *The Crucial Role of Trehalose and Structurally Related Oligosaccharides in the Biosynthesis and Transfer of Mycolic Acids in Corynebacterineae.* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(28): p. 26573-26585.
206. Bongiovanni, M.D. and J.C. Lobartini, *Particulate organic matter, carbohydrate, humic acid contents in soil macro- and microaggregates as affected by cultivation.* Geoderma, 2006. **136**(3–4): p. 660-665.
207. Cabria, F., M. Calandroni, and G. Monterubbianesi, *Tamaño y estabilidad de agregados y su relación con la conductividad hidráulica saturada en suelos bajo labranza convencional y praderas.* Ciencia del Suelo, 2002. **20**: p. 69-80.
208. Slepetiene, A. and J. Slepetys, *Status of humus in soil under various long-term tillage systems.* Geoderma, 2005. **127**(3–4): p. 207-215.
209. Jiao, Y., J.K. Whalen, and W.H. Hendershot, *No-tillage and manure applications increase aggregation and improve nutrient retention in a sandy-loam soil.* Geoderma, 2006. **134**(1–2): p. 24-33.
210. Plaza-Bonilla, D., et al., *Soil aggregation and organic carbon protection in a no-tillage chronosequence under Mediterranean conditions.* Geoderma, 2013. **193–194**(0): p. 76-82.
211. Tivet, F., et al., *Soil organic carbon fraction losses upon continuous plow-based tillage and its restoration by diverse biomass-C inputs under no-till in sub-tropical and tropical regions of Brazil.* Geoderma, 2013. **209–210**(0): p. 214-225.
212. Dong, L., et al., *Humic acids buffer the effects of urea on soil ammonia oxidizers and potential nitrification.* Soil Biology and Biochemistry, 2009. **41**(8): p. 1612-1621.
213. Roux-Michollet, D., et al., *Effects of steam disinfestation on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil.* Soil Biology and Biochemistry, 2008. **40**(7): p. 1836-1845.
214. Gelfand, I. and D. Yakir, *Influence of nitrite accumulation in association with seasonal patterns and mineralization of soil nitrogen in a semi-arid pine forest.* Soil Biology and Biochemistry, 2008. **40**(2): p. 415-424.
215. Taylor, P.G. and A.R. Townsend, *Stoichiometric control of organic carbon-nitrate relationships from soils to the sea.* Nature, 2010. **464**(7292): p. 1178-1181.
216. Choi, W.-J., et al., *Available organic carbon controls nitrification and immobilization of ammonium in an acid loam-textured soil.* .Agricultural Chemistry and Biotechnology, 2006. **49**(1): p. 28-32.
217. Sieber, J.R., M.J. McInerney, and R.P. Gunsalus, *Genomic Insights into Syntrophy: The Paradigm for Anaerobic Metabolic Cooperation.* Annual Review of Microbiology, 2012. **66**(1): p. 429-452.
218. McInerney, M.J., J.R. Sieber, and R.P. Gunsalus, *Syntrophy in anaerobic global carbon cycles.* Current Opinion in Biotechnology, 2009. **20**(6): p. 623-632.
219. Butler, J., N. Young, and D. Lovley, *Evolution from a respiratory ancestor to fill syntrophic and fermentative niches: comparative genomics of six Geobacteraceae species.* BMC Genomics, 2009. **10**(1): p. 1-10.
220. Schink, B., *Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997. **61**(2): p. 262-280.
221. Gan, Y., et al., *Syntrophic Oxidation of Propionate in Rice Field Soil at 15 and 30°C under Methanogenic Conditions.* Applied and Environmental Microbiology, 2012. **78**(14): p. 4923-4932.
222. Chauhan, A., A. Ogram, and K.R. Reddy, *Syntrophic-Methanogenic Associations along a Nutrient Gradient in the Florida Everglades.* Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(6): p. 3475-3484.

223. Lu, F., et al., *Metaproteomics of cellulose methanisation under thermophilic conditions reveals a surprisingly high proteolytic activity.* ISME J, 2014. **8**(1): p. 88-102.
224. Kim, H.J., et al., *Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(47): p. 18188-18193.
225. McInerney, M.J., et al., *The genome of Syntrophus aciditrophicus: Life at the thermodynamic limit of microbial growth.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(18): p. 7600-7605.
226. Souza, R.C., et al., *Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession.* Applied Soil Ecology, 2013. **72**(0): p. 49-61.
227. Mendes, R., et al., *Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria.* Science, 2011. **332**(6033): p. 1097-1100.
228. Ward, N.L., et al., *Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils.* Applied and Environmental Microbiology, 2009. **75**(7): p. 2046-2056.
229. Deutscher, J., C. Francke, and P.W. Postma, *How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006. **70**(4): p. 939-1031.
230. Charles, E.W., et al., *Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose*, in *Polysaccharides*. 2004, CRC Press.
231. Shelp, B.J., A.W. Bown, and D. Faure, *Extracellular -Aminobutyrate Mediates Communication between Plants and Other Organisms.* Plant Physiology, 2006. **142**(4): p. 1350-1352.
232. Dover, S. and Y.S. Halpern, *Control of the Pathway of γ-Aminobutyrate Breakdown in Escherichia coli K-12.* Journal of Bacteriology, 1972. **110**(1): p. 165-170.
233. Borcard, D., P. Legendre, and P. Drapeau, *Partialling out the Spatial Component of Ecological Variation.* Ecology, 1992. **73**(3): p. 1045-1055.
234. Smouse, P.E., J.C. Long, and R.R. Sokal, *Multiple Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence.* Systematic Zoology, 1986. **35**(4): p. 627-632.
235. McGill, B.J., et al., *Species abundance distributions: moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework.* Ecology Letters, 2007. **10**(10): p. 995-1015.
236. Magurran, A.E., *Measuring Biological Diversity*. 2005: Wiley.
237. Izsák, J. and S. Pavoine, *Links between the species abundance distribution and the shape of the corresponding rank abundance curve.* Ecological Indicators, 2012. **14**(1): p. 1-6.
238. Tokeshi, M., *Species Abundance Patterns and Community Structure*, in *Advances in Ecological Research*, M. Begon and A.H. Fitter, Editors. 1993, Academic Press. p. 111-186.
239. Preston, F.W., *The Commonness, And Rarity, of Species.* Ecology, 1948. **29**(3): p. 254-283.
240. MacArthur, R.H., *ON THE RELATIVE ABUNDANCE OF BIRD SPECIES.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1957. **43**(3): p. 293-295.
241. MOTOMURA, I., *On the statistical treatment of communities.* Zoological Magazine, 1932. **44**: p. 379-383.
242. Borcard, D. and P. Legendre, *All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices.* Ecological Modelling, 2002. **153**(1–2): p. 51-68.
243. Blanchet, F., P. Legendre, and D. Borcard, *Forward selection of explanatory variables.* Ecology, 2008. **89**: p. 2623-2632.

244. Legendre, P., *Studying beta diversity: ecological variation partitioning by multiple regression and canonical analysis.* Journal of Plant Ecology, 2008. **1**(1): p. 3-8.
245. Jabot, F., R.S. Etienne, and J. Chave, *Reconciling neutral community models and environmental filtering: theory and an empirical test.* Oikos, 2008. **117**(9): p. 1308-1320.
246. Akaike, H., *A new look at the statistical model identification.* IEEE Transactions on Automatic Control, 1974. **19**: p. 716-723.
247. Feinstein, L.M. and C.B. Blackwood, *Taxa–area relationship and neutral dynamics influence the diversity of fungal communities on senesced tree leaves.* Environmental Microbiology, 2012. **14**(6): p. 1488-1499.
248. Podani, J. and I. Miklós, *RESEMBLANCE COEFFICIENTS AND THE HORSESHOE EFFECT IN PRINCIPAL COORDINATES ANALYSIS.* Ecology, 2002. **83**(12): p. 3331-3343.
249. Rascovan, N., *Abriendo la caja negra de los microbiomas ambientales argentinos. Caracterizaciones funcionales y ecológicas en lagunas de altura andinas y suelos de la pampa húmeda con secuenciación de alto rendimiento*, F.d.C.E.y.N.U.d.B. Aires, Editor. 2013: Buenos Aires. p. 1- 253.
250. Colombo, R., *Diversidad de hongos microrrícicos arbusculares de la Pampa Ondulada desde dos puntos de vista: morfológico y metagenómico*, F.d.C.E.y.N.U.d.B. Aires, Editor. 2014. p. 1- 150.

Que el pan sea eterno, y las quinuas eternas,

y nuestra **Pachamama** todavía más eterna.

Que el agua, el viento, y la lluvia,

corran enternamente,

que el Sol nos alumbre con eternidad infinita,

que las gentes y los surcos sean eternos,

que las flores broten para siempre

y los pájaros vuelen incansables sobre las flores.

Que haya vida para la eternidad

en su existencia interminable

Canto Kechwa