Biblioteca Digital
FCEN-UBA

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

Tesis Doctoral

Comunidades bacterianas en suelos bajo siembra directa en la región agropecuaria pampeana. Influencia del manejo y propuesta de nuevos indicadores biológicos

Guerrero, Leandro Demián

2012

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:
Guerrero, Leandro Demián. (2012). Comunidades bacterianas en suelos bajo siembra directa en la región agropecuaria pampeana. Influencia del manejo y propuesta de nuevos indicadores biológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Guerrero, Leandro Demián. "Comunidades bacterianas en suelos bajo siembra directa en la región agropecuaria pampeana. Influencia del manejo y propuesta de nuevos indicadores biológicos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

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

Departamento de Química Biológica

Comunidades bacterianas en suelos bajo siembra directa en la región agropecuaria pampeana. Influencia del manejo y propuesta de nuevos indicadores biológicos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Leandro Demián Guerrero

Director de Tesis: Dr. Leonardo Erijman

Consejera de Estudios: Dra. María Julia Pettinari

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
INGEBI – CONICET
"Dr. Héctor N. Torres"

Buenos Aires, 2012

Índice

Resumen ……. **1**

Abstract …….. **3**

Introducción ……..…….. **4**

El suelo **4**

La biología del suelo **5**

Patrones en la diversidad del suelo **7**

Microorganismos en el suelo **10**

Principales actividad de las bacterias en el suelo y grupos relacionados **15**

Degradación de la materia orgánica 15

Ciclo del nitrógeno 18

Transformación del fósforo 24

Transformación del azufre 25

Micronutrientes y elementos traza 25

El ambiente agrícola **27**

Los microorganismos en el ambiente agrícola **31**

Indicadores biológicos **32**

La agricultura en Argentina **35**

Buenas prácticas agrícolas **36**

Agricultura certificada **37**

El consorcio BIOSPAS **38**

Objetivos ……...……..… **39**

Materiales y Métodos ……..……... **40**

Descripción de los Sitios y Muestreo **40**

Extracción de ADN **42**

Pirosecuenciación **44**

Análisis bioinformático de las secuencias **44**

Construcción de los Árboles filogenéticos **46**
Cuantificación de bacterias por PCR en tiempo real (qPCR) **47**
Nuevos oligonucleótidos diseñados **50**
Análisis estadístico de los resultados de qPCR **51**
DGGE **52**
Análisis de los resultados de DGGE **53**
Detección de indicadores **54**

Resultados …….……. **56**

Descripción de los suelos y manejos **56**
Bacteria Total **58**
Composición general de las comunidades **59**
Principales grupos de bacterias **65**
Actinobacteria **66**
Acidobacteria **70**
Alfaproteobacteria **75**
Betaproteobacteria **78**
Firmicutes **83**
Gammaproteobacteria **85**
Indicadores de Tratamiento **92**
Acidobacteria Gp1 93
Género Rubellimicrobium 95
Propuesta para un Índice Biológico de manejo agrícola **96**

Discusión y Conclusiones ……..……. **99**

Diversidad y composición de las comunidades de bacterias **100**
Propuesta de indicadores de manejo agrícola **104**
Conclusiones y perspectivas **106**

Bibliografía ……..…… **108**

Agradecimientos:

Al Dr. Leonardo Erijman, mi director de tesis, por haberme recibido en su laboratorio, y por haber confiado en mi y darme la oportunidad de realizar mi trabajo bajo su dirección.

A mis compañeros de grupo, Eva, Joaquín, Silvina, Federico y Victoria. Con quienes no solo compartí el mismo interés por la biología y a quienes agradezco enormemente por colaborar con migo en cada aspecto de mi tesis. En quienes encontré algunos de los mejores amigos que pueda tener.

Al Dr. Jorge Muschietti y todos los miembros de su laboratorio, Agustina, Mariana, Romina, Maria Laura, Juliana y Regina. Donde encontré no solo excelentes compañeros dentro del laboratorio sino también fuera de él.

A la Dra. Mirtha Flawiá y el Dr Hector Torres, quienes desde el momento que llegué al instituto me recibieron para formar parte de él.

A todos los integrantes del INGEBI, que siempre de una u otra manera colaboraron conmigo en cualquier cosa que necesité, y encontré en muchos de ellos una gran amistad.

A todos los que participaron del consorcio BIOSPAS, especialmente al Dr. Luis Wall, por su colaboración en todos los aspectos relacionados al proyecto en el cual pude desarrollar mi trabajo para esta tesis.

A Diego y a Tamara, a quienes considero dos de las personas más extraordinarias y maravillosas y de quienes me siento feliz por haber conocido y compartido tantas cosas desde el primer día.

A mi familia, porque ellos me apoyaron en cada paso y en cada decisión que tomé durante todo este tiempo y porque se que siempre lo seguirán haciendo.

Comunidades bacterianas en suelos bajo siembra directa en la región agropecuaria pampeana. Influencia del manejo y propuesta de nuevos indicadores biológicos

Resumen

Los suelos son considerados uno de los ambientes más diversos y heterogéneos que se conocen. En ellos se producen innumerables procesos que permiten el reciclado y transformación de sustancias esenciales para la vida de plantas y animales. La mayoría de estos procesos son realizados por bacterias, y se ven afectados por distintos factores en el ambiente. Una de las principales causas que modifican estos ecosistemas es la producción agrícola. En los últimos tiempos el desarrollo de nuevas tecnologías, como la siembra directa podrían atenuar parcialmente el impacto de esta explotación. Sin embargo, el uso sustentable implica también la aplicación de prácticas de manejo, que incluyen rotaciones de cultivos, reposición de nutrientes y manejo integral de plagas. En este trabajo estudiamos la composición y dinámica de las comunidades de bacterias bajo prácticas contrastantes en siembra directa, con los objetivos de determinar de qué manera las prácticas agrícolas impactan sobre el suelo, y encontrar variaciones en las comunidades que puedan servir como indicadores de biológicos de calidad del suelo. Para el estudio se analizaron ambientes naturales y dos tratamientos de siembra directa que difieren principalmente en el régimen de rotación de cultivos, y otras características que los separan en Buenas y Malas prácticas agrícolas. Se tomaron datos de cuatro localidades diferentes de la región que abarca desde la provincia de Córdoba hasta Entre Ríos durante un periodo de dos años. Mediante la utilización de herramientas moleculares encontramos que las diferencias entre los distintos ambientes a nivel de las comunidades de bacterias y los taxones mayoritarios se ven influenciadas en primer lugar por las diferencias geográficas y en menor medida por los efectos del uso del suelo. A medida que aumentamos el nivel de resolución taxonómica encontramos que existen diferencias para determinados grupos que pueden separar las Buenas de las Malas prácticas. El número de bacterias pertenecientes al grupo de Acidobacteria Gp1 y al género *Rubellimicrobium* varían de forma dependiente de los tratamientos, por lo cual son potenciales candidatos como indicadores de calidad de suelos. Para esto proponemos la confección de un índice calculado como el cociente entre la proporción de bacterias de cada grupo encontradas en la muestra (Acidobacteria Gp1/*Rubellimicrobium*), respecto del número encontrado en un ambiente natural próximo.

Palabras claves: Microbiología de suelos, diversidad bacteriana, siembra directa, indicadores biológicos, ARNr 16S.

Bacterial communities in soils under no-till crop production in the pampas region. Influence of management and proposal of new biological indicators

Abstract

The soil is considered one of the most diverse and heterogeneous environments. They produce many processes that enable the recycling and transformation of substances essential for plant life and animals. Most of these processes are performed by bacteria, and are affected by different factors in the environment. One of the main causes that modify these ecosystems is agricultural production. The recent development of new technologies, such as no-till crop could reduce the impact of this exploitation. However, the sustainable use also involves the implementation of management practices, including crop rotations, nutrient replenishment and integrated pest management. In this work we have studied the composition and dynamics of bacterial communities under contrasting no-till crop systems in order to determine how impacts on soil, and to find variations in the communities that can serve as biological indicators of soil quality. For the study, two tillage treatments that differ mainly in the rotation regime and other features that separate into good and poor agricultural practices were analyzed. Data were collected from four different locations in the region from the province of Cordoba to Entre Rios for a period of two years. Using molecular tools we found that the differences between the different environments at the level of bacterial communities and major taxa, are influenced primarily by geographic differences and in lesser extent by the effects of land use. As we increased the level of taxonomic resolution, we found that there were differences for certain groups that can separate good from poor practices. The number of bacteria belonging to the Acidobacteria Gp1 group and the genus *Rubellimicrobium* varied depending on the treatments, suggesting that they could be potential candidates indicators of soil quality. To this end we propose the confection of an index calculated as the ratio (Acidobacteria Gp1/*Rubellimicrobium*) between the proportion of each group of bacteria found in the sample and the number found in a nearby grassland soil.

Key words: Soil microbiology, bacterial diversity, no-till crop, biological indicators, 16S rRNA.

El suelo

El suelo forma una delgada capa que cubre la superficie de la Tierra y actúa como interfase entre la atmósfera y la litosfera, la capa más externa de corteza terrestre. Es un sistema formado por minerales, agua, gases, raíces de plantas y materia orgánica en distintas etapas de descomposición. El suelo también provee el medio para que vivan una asombrosa variedad de organismos. Estos organismos no solo habitan el suelo y lo usan como fuente de energía, también contribuyen con su formación, afectando las propiedades físicas y químicas, y la naturaleza de la vegetación que crece en él.
Se reconocen cinco factores principales que dan origen al suelo: la materia parental, el clima, la biota, la topografía y el tiempo (Jenny 1941). Son altamente interactivos y todos desempeñan un papel importante en el desarrollo de cualquier tipo de suelo. Las combinaciones de estos factores llevan a la formación de tipos únicos de suelos, pero con capas (horizontes) relativamente predecibles que componen el perfil del suelo (Fig. 1.1).

La superficie del suelo es donde vive la mayoría de los organismos y donde ocurren el crecimiento de las raíces y el reciclado de nutrientes. Esta capa es conocida como horizonte O, que se forma cuando la materia orgánica en descomposición se acumula en la superficie. La capa superior (L) está formada por los restos vegetales y de animales producidos durante el año, y muchas veces no es considerada parte del suelo. Sobre el horizonte A, que está compuesto mayoritariamente por minerales, pero también mezclado con materia orgánica proveniente de la capa superior, se encuentran capas formadas por materia orgánica en distintos estados de descomposición. La capa F, está formada por desechos de los últimos años parcialmente descompuestos y la capa H está compuesta por desechos completamente descompuestos, generalmente mezclada con la capa mineral que se encuentra por debajo.

Variaciones en los factores que dan forma al suelo determinan la naturaleza física y química de los suelos, que a su vez influyen en gran medida en la naturaleza de la biota y por lo tanto sobre las propiedades de descomposición y el ciclo de nutrientes del ecosistema. Variaciones en las propiedades del suelo, especialmente la matriz física, también influyen enormemente sobre el movimiento del agua y materiales asociados, tanto dentro como entre ecosistemas.

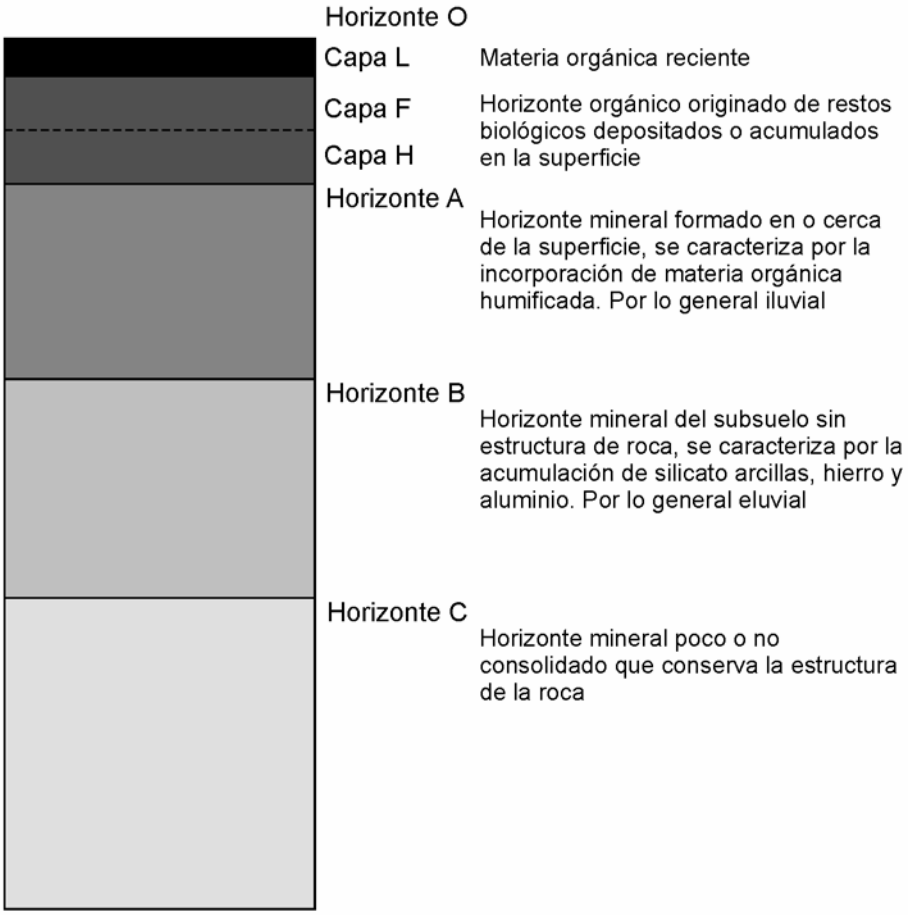

Fig.1.1: Perfil del suelo donde se distinguen los distintos horizontes y capas.

La biología del suelo

El "enigma de la diversidad del suelo" planteado por Anderson en 1975 (Anderson 1975) todavía existe: ¿Cómo se explica la gran diversidad de la biota en los suelos y cómo es posible que muchas especies de organismos puedan coexistir sin que ocurra exclusión competitiva?

Tal vez la respuesta más convincente reside en la naturaleza extremadamente variable del ambiente del suelo en sí: el suelo ofrece un hábitat sumamente heterogéneo, tanto espacial como temporalmente. Esto se traduce en diversidad de hábitats, la que abre posibilidades sin igual para la partición de nichos, o la especialización de hábitats o recursos, y a su vez permite la coexistencia de las especies.

El hábitat del suelo se caracteriza por la heterogeneidad a través de todas las escalas, desde nanómetros a kilómetros, que difieren en características químicas, físicas y biológicas, tanto en el espacio como en el tiempo.

Para los organismos superiores, como los animales que se extienden sobre amplios territorios, los hábitat pueden ser en la escala de un paisaje o toda una cuenca e incluso más allá. Al otro extremo, para los microorganismos, el hábitat se reduce a una microescala y por lo tanto se ha referido a él como microhábitat (Bardgett 2005).

Las características espaciales del hábitat en general, así como las características específicas de los microhábitats, deben ser consideradas en la descripción de la actividad de los microorganismos del suelo. Microregiones dentro de los agregados del suelo controlan la naturaleza y disponibilidad de los recursos de nutrientes, afectando directamente la dinámica de población.

La heterogeneidad espacial contribuye a la coexistencia de las especies en las comunidades microbianas del suelo, aumentando su biodiversidad en general. De hecho, los organismos del suelo no suelen estar distribuidos al azar sino que exhiben patrones predecibles en distintas escalas espaciales (Ettema 2002) (Fig. 1.2).

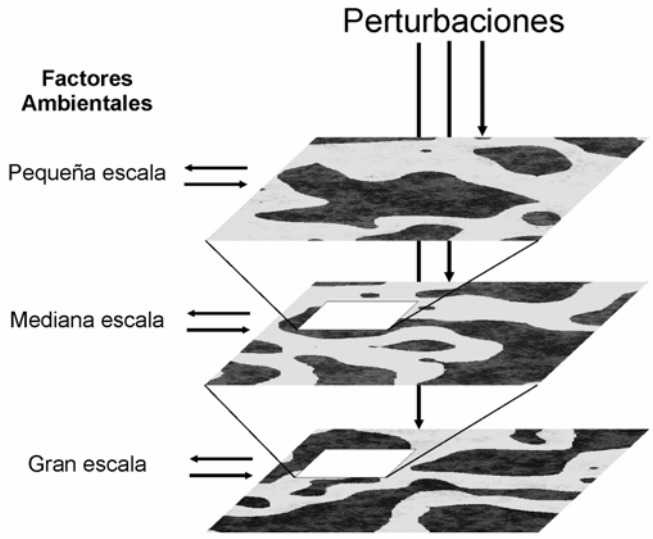

Fig. 1.2: La Heterogeneidad espacial en las distribuciones de organismos del suelo se produce en escalas anidadas y está conformada por una jerarquía espacial de los factores ambientales, los procesos intrínsecos de la población, y las perturbaciones (flechas verticales). Estas perturbaciones operan en todas las escalas espaciales y pueden ser un factor clave en la heterogeneidad espacial. Interacciones entre los patrones espaciales de la actividad biótica del suelo y la heterogeneidad de los factores ambientales añade más complejidad al sistema (flechas horizontales).

Patrones en la diversidad del suelo

Existen casi infinitas variaciones en los patrones de diversidad entre y dentro de los ecosistemas de la Tierra. Además, estos patrones cambian constantemente con el tiempo, y la diversidad en una localidad en particular puede variar en gran medida tanto a largo plazo como resultado de los procesos de sucesión y del cambio evolutivo, como dentro del período de uno o unos pocos años (Bardgett 2005).

Esta enorme complejidad espacial y temporal en la diversidad, que se produce tanto sobre el suelo como por debajo de él, hace que sea extremadamente difícil evaluar y explicar los patrones de riqueza de especies. Sin embargo, las preguntas cuidadosamente enmarcadas sobre la diversidad de especies que reconocen la existencia de tal complejidad, pueden dar idea de la amplia gama de procesos que controlan la diversidad en un rango de escalas espaciales y temporales.

Escala global. Una gran cantidad de patrones globales de variación espacial de la biodiversidad han sido explorados, y probablemente el más prominente es el gradiente latitudinal en la riqueza de especies. Desde hace tiempo se reconoce que el número de especies en la mayoría de los grupos taxonómicos es más bajo en los polos y aumenta hacia los trópicos (Adams 2009). Sin embargo, esta información proviene casi exclusivamente de estudios de organismos que viven sobre el suelo, y virtualmente nada se sabe de los organismos que viven en él. Por lo tanto, es bastante arriesgado especular demasiado acerca de los patrones latitudinales de la biodiversidad del suelo.

Algunos ecólogos incluso dudan que estos patrones existan para la biología del suelo, al menos en las regiones templadas y tropicales. Esto se basa en las teorías que sugieren que muchos organismos del suelo, especialmente los microorganismos y la microfauna, son cosmopolitas, y capaces de migrar considerablemente a través de todo el mundo (Finlay, 1999). Por otra parte, la abundancia de individuos de especies de microorganismos de vida libre es tan grande que su dispersión es rara vez (o nunca) limitada por barreras geográficas (Finlay 2002). Sin embargo, existen cuestionamientos acerca de que ciertos grupos taxonómicos de la biota del suelo sean cosmopolitas, debido a que se conoce que algunos ciliados de vida libre (Foissner 1999) y bacterias heterotróficas del suelo poseen una distribución biogeográfica restringida (Cho 2000). Además, se considera que las estimaciones de la diversidad biológica global del suelo son

altamente especulativas, ya que sólo una pequeña fracción de los hábitats potenciales de todo el mundo han sido cuidadosamente analizados.

Escala a nivel del paisaje. A este nivel, los patrones del suelo se relacionan principalmente con factores tales como el tipo de suelo y la topografía, y con perturbaciones y la distribución de la vegetación (Turner 2001). Por ejemplo, suelos fértiles asociados a los ecosistemas productivos, tales como los bosques de hoja caduca y las praderas templadas, tienden a mantener un gran número de plantas, animales y diversidad microbiana debido a la amplia provisión de recursos y a un alto grado de heterogeneidad, causada en gran parte por las actividades de los propios organismos. Por el contrario, las duras condiciones climáticas y la abundancia de materia orgánica recalcitrante típica de los suelos improductivos, significa un menor número de especies presentes (Ponge 2003). Este tipo de patrón es también evidente a una escala más local, como en los bosques, donde las diferencias en la calidad de los desechos debajo de distintas especies de árboles que coexisten, producen zonas de influencia que explican la distribución desigual de los procesos y organismos del suelo (Weber 2011). Por otro lado, en ecosistemas donde la vegetación es escasa, los factores abióticos determinan los patrones espaciales de biodiversidad.

Otro factor importante que afecta la distribución de la biodiversidad del suelo a nivel de paisaje son las perturbaciones físicas, que generalmente conducen a una reducción drástica en la diversidad. Sin embargo, la magnitud de estos efectos depende del tipo de suelo, clima y operaciones de labranza en los suelos agrícolas (Ernst 2009, Errouissi 2011).

Otros estudios que han examinado las perturbaciones derivadas de la conversión de zonas de vegetación natural a la agricultura, muestran que la diversidad de la biota del suelo se reduce en respuesta al cambio del uso del suelo. Por ejemplo, la conversión del bosque tropical primario en terrenos para agricultura produce una drástica reducción de la biomasa microbiana (Dlamini 2004). La diversidad fenotípica de las comunidades microbianas de los pastizales templados también se reduce como consecuencia de los disturbios causados por una intensa actividad agrícola (Bardgett 2001).

Es importante señalar que posiblemente sean numerosas las causas que interactúan en la disminución de la diversidad de la biota del suelo como resultado de la conversión de los ecosistemas naturales en terrenos para agricultura. Sin embargo, las perturbaciones físicas resultantes de la preparación del sitio para el cultivo y la disminución de la cantidad y complejidad de los residuos orgánicos devueltos al suelo, probablemente sean los factores más

importantes (Malézieux 2009). La materia orgánica devuelta al suelo en los sistemas agrícolas, generalmente proveniente de uno o pocos cultivos diferentes, es también de menor complejidad que la de los ecosistemas nativos.

La diversidad de descomponedores es típicamente más compleja en mezclas de desechos que en los provenientes de sustratos simples (Hansen 2000). No siempre los cambios en el uso del suelo tienen efectos negativos sobre su biota. En efecto, algunos suelos alterados pueden tener comunidades muy diversas, sobre todo cuando las perturbaciones aumentan la heterogeneidad espacial, proporcionando con ello oportunidades para que un mayor número de especies convivan.

Escala local. Los patrones a escala local, en el rango de centímetros a metros, están principalmente relacionados con la heterogeneidad del hábitat, en términos de complejidad de la estructura del ambiente y compuestos químicos utilizados como recursos. Como se mencionó anteriormente, el suelo es muy variable en su estructura y composición, y todos los suelos son heterogéneos en distintas escalas. Esto ofrece oportunidades inigualables a los organismos para establecerse en distintos nichos y convivir (Ettema 2002, Bardgett 2005), pero también conduce a extremas variaciones en las propiedades biológicas del suelo a nivel de las comunidades (Bardgett 2005b).

Las raíces generan heterogeneidad en el suelo, a través de efectos físicos en la estructura, su muerte y descomposición, y por medio del exudado de compuestos en la zona próxima a la raíz, denominada rizosfera.

La heterogeneidad en micro-escala, por ejemplo a nivel de las partículas del suelo, puede ser extremadamente alta, por ejemplo, proporcionando gradientes en la concentración de oxígeno a lo largo de unos pocos milímetros (Askaer 2010). Estas variaciones a micro-escala pueden actuar como un factor determinante en la diversidad microbiana del suelo (Remenant 2009).

En conclusión, variaciones espaciales y temporales, desde la escala de una particula a la de todo un horizonte, junto con la enorme especialización de la biota del suelo, actúan como el mayor determinante de los patrones de biodiversidad a escala local.

Distribución vertical en el perfil del suelo. Otro de los factores importantes a tener en cuenta en suelos, y que es una de las características principales que lo definen como ambiente, es la distribución vertical de los organismos que lo habitan a través de su perfil.

La abundancia y biomasa de la mayoría de los organismos del suelo son mayores en los primeros 0-10 cm de la superficie del suelo y disminuyen con la profundidad junto con el contenido de materia orgánica y la disponibilidad de presas. Aproximadamente el 65% de la biomasa microbiana total se encuentra en los primeros 25 cm del perfil del suelo. Por debajo de esa profundidad, la densidad microbiana por lo general disminuirá entre 1 y 3 órdenes de magnitud (Fierer 2003) (Fig. 1.3).

Aunque en general la cantidad y actividad de los organismos del suelo a mayor profundidad son bajas, varían espacialmente en función de gradientes de textura, pH, temperatura, disponibilidad de agua y contenido de materia orgánica (Will 2010). Las interfases entre las capas a menudo generan regiones localizadas de mayor saturación, donde los microorganismos pueden presentar un mayor número o actividad debido a un mejor acceso a los nutrientes. Los microorganismos en los horizontes más profundos del suelo tienden a estar más limitados en carbono (C) que los microorganismos de la superficie.

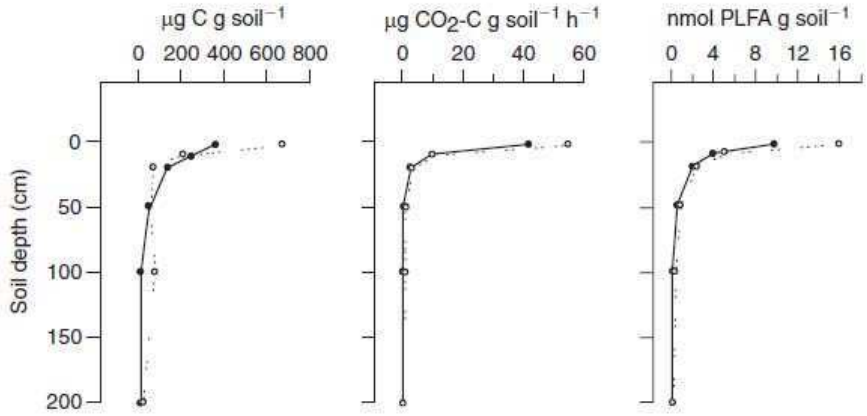

Fig. 1.3: Cambio de la biomasa microbiana con la profundidad. Perfil de suelo de un valle (círculos blancos) y en terrazas (círculos negros) determinada por tres métodos. (Izquierda) Fumigación con cloroformo. (Medio) Respiración inducida por sustrato. (Derecha) Análisis de ácidos grasos (PLFA) (Fierer 2003).

Microorganismos en el suelo

Debido a que el suelo provee un formidable rango de habitats, el mismo mantiene una enorme biomasa y alberga mucha de la diversidad genética de la Tierra. Los microorganismos son, por lejos, los miembros más abundantes y diversos que pueden encontrarse en el suelo. Un gramo de

suelo contiene kilómetros de hifas de hongos y más de 10^{10} bacterias, pertenecientes a decenas de miles de especies diferentes (Paul 2007). Estos dos grupos representan los principales consumidores de la red alimenticia en el suelo y son responsables de la degradación y mineralización de sustancias orgánicas complejas.

El rol primario de los hongos es descomponer la materia orgánica a través de la producción de una amplia gama de enzimas extracelulares. En virtud de su gran biomasa representan una porción significativa de los nutrientes del ecosistema. En pastizales, por ejemplo, pueden llegar a 250 Kg ha^{-1} de hifas secas en los primeros 5 cm de la superficie, conteniendo tanto como 8 Kg de Nitrógeno (N) y 2 Kg de Fósforo (P) (Bardgett 1993).
Los hongos además tienen otras importantes funciones en el suelo. Actúan como patógenos de plantas, mantienen unidas las partículas del suelo aumentando la estabilidad estructural, y proveen alimento a la fauna. Algunos hongos, como las micorrizas, forman mutualismos con las raíces de las plantas, proveyendo nutrientes limitantes como P a la planta y recibiendo a cambio compuestos de C y un espacio libre de competidores (Simard 2004).

Las bacterias del suelo son conspicuas por su abundancia y ubicuas incluso en los ambientes y suelos más extremos. El uso de técnicas moleculares han mostrado que la diversidad de bacterias en el suelo es enorme, y varios órdenes de magnitud mayor de lo que se estimaba previamente. Por estudios de ADN se cree que en un puñado de suelo puede haber más de 10.000 genotipos distintos (Torsvik et al. 2002) y tanto como 10^{9}-10^{11} bacterias por gramo de suelo (Horner-Devine 2004) (Tabla 1.1).

Hábitat	**Abundancia (células cm^{-3})**	**Diversidad (genomas equivalentes)**
Bosque	$4{,}8x10^{9}$	6000
Pastura	$1{,}8x10^{7}$	3500-8800
Agrícola	$2{,}1x10^{10}$	140-350

Tabla 1.1: Abundancia y diversidad de procariotas en distintos suelos (Torsvik 2002).

Al igual que los hongos, las bacterias heterotróficas tienen la capacidad de degradar un amplio rango de compuestos orgánicos a través de la producción de enzimas extracelulares. Como reflejo de su diversidad taxonómica, la diversidad metabólica de las bacterias es igualmente inmensa. Esto quizás, es mejor ilustrado por la habilidad de las bacterias para degradar muchos compuestos xenobióticos tóxicos para la mayoría de otros organismos. Ciertos grupos de bacterias también llevan a cabo funciones específicas de gran importancia ecológica. Por ejemplo, bacterias quimioautótrofas nitrificantes son importantes para el ciclo del N, ya que se encargan de la oxidación de amonio a nitrato, tanto en suelos naturales y agrícolas. Simbiontes fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* y otros, infectan las raíces de las leguminosas, e incrementan considerablemente el aporte de N al sistema. Algunas bacterias de vida libre también llevan a cabo este proceso de fijación de N, como los miembros de los géneros *Azotobacter* y *Clostridium* (Bardgett 2005).

Análisis moleculares de diferentes suelos agrícolas de zonas templadas han indicado que generalmente la mayoría de las bacterias encontradas pertenecen a algunos de los grupos mayoritarios (Nacke 2011, Chen 2011, Yin 2010). Estos grupos son el filo Proteobacteria con las clases de Alfa-, Beta-, y Gammaproteobacteria, y los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetales, Verrucomicrobia, Acidobacteria y Firmicutes. Cabe señalar que a partir de algunos de estos grupos (ej. Proteobacterias o Actinobacteria), muchas bacterias diferentes pueden ser recuperadas de muestras de suelo mediante técnicas de cultivo clásicas, pero otras normalmente se pierden. En el caso de los procariotas cultivados, pueden aplicarse estudios de laboratorio para caracterizar su composición genética y la actividad fisiológica más en detalle, y por lo tanto, en muchos casos se puede tener una buena idea del potencial de su importancia ecológica. Que en el caso de los "aún no cultivables", evidentemente, es más críptica.
Las Proteobacterias son un grupo fisiológica y morfológicamente diverso (Gupta 2000, Zayarzin 1991). Las Alfaproteobacterias incluyen muchas bacterias que interactúan con huéspedes eucariotas. Las interacciones con plantas comprenden la colonización de la rizosfera, y el establecimiento de relaciones patógenas o simbióticas. Importantes ejemplos de esto son las enfermedades causadas en plantas por *Rhizobium tumefaciens* (anteriormente *Agrobacterium tumefaciens*) (Chen 2008) y la formación de nódulos de las raíces que fijan el nitrógeno en las leguminosas por los diferentes miembros del grupo de *Rhizobium* (Martinez-Romero 2009). La clase Alfaproteobacteria también incluye bacterias que infectan a invertebrados que habitan en el

suelo (ej. *Wolbachia* de colémbolos) (Czarnetzki 2004). Otros Alfaproteobacteria que habitan el suelo, como *Methylomonas* sp., aeróbicamente utilizan metano u otros compuestos de un carbono (C1) como fuente de carbono y energía (Chen 2003, LeMer 2001).

Las Beta y Gammaproteobacteria incluyen muchos organismos de crecimiento relativamente rápido, que pueden ser muy abundantes en diferentes suelos. Representantes típicos de estos grupos incluyen los géneros *Burkholderia*, *Comamonas*, *Variovorax* (todos Betaproteobacteria), y *Stenotrophomonas* o *Pseudomonas* (ambos Gammaproteobacteria).

Las Actinobacterias son bacterias Gram-positivas y muchas de ellas se consideran organismos típicos del suelo (Gremion 2003, Holmes 2000, Rheims 1999). Son metabólicamente versátiles, y la mayoría son formadoras de esporas y por lo tanto pueden resistir períodos de sequía.

Los miembros más prominentes y abundantes incluyen a *Rhodococcus*, *Frankia* (induce la fijación de nitrógeno molecular en nódulos de las raíces de los árboles), y muchas especies del género *Streptomyces.* Estos organismos son habitantes típicos de las capas de detritos, son capaces de producir antibioticos e influir sobre la salud de las plantas (Schlatter 2009).

A pesar de su evidente importancia cuantitativa en suelos, sólo unas pocas especies de Planctomycetes, Verrucomicrobia y Acidobacteria han sido cultivadas y caracterizadas. Por lo tanto, se sabe poco sobre sus potenciales genéticos, sus propiedades fisiológicas, o adaptaciones ecológicas (Buckley 2006, Sangwan 2005, Kielak 2010, Ward 2009).

Hasta la fecha, sólo dos aislamientos de Planctomycetes se han obtenido a partir de cultivos del suelo (una de las especies relacionadas con el género *Gemmata* y otra con *Isosphaera*) (Wang 2002). Curiosamente, el filo Planctomycetes también incluye bacterias capaces de oxidar amonio en condiciones anaeróbicas en la presencia de nitrito (bacterias anammox) (Francis 2007). Queda aún pendiente determinar si estas bacterias u otras relacionadas son también activas en nichos anaeróbicos en el suelo.

El filo Verrucomicrobia sólo está representado por unas pocas especies cultivadas y no está claro cuán representativos son para este gran grupo. Algunas cepas aisladas a partir de cultivos de arroz se caracterizan por un metabolismo anaeróbico, y la mayoría de las Verrucomicrobia tienen un tamaño celular muy pequeño ("ultramicrobacteria") (Chin 2001, Schlesner 2006). Otros miembros son inmóviles con apéndices celulares, como *Verrucomicrobium espinosum* (Schlesner 1987) o *Prosthecobacter* (Hedlund 1997). La gama ecológica dentro de este grupo parece ser grande, ya que recientemente algunas especies del género *Xiphinematobacter* han sido caracterizadas como endosimbiontes obligados de nematodos (Vandekerckhove 2002).

El filo Acidobacteria, a pesar de su gran abundancia en muchos suelos, también está representado por sólo unos pocos géneros cultivados (ej. *Acidobacterium*, *Geothrix* y *Holophaga*) (Barns 1999, Kielak 2009, Eichorst 2011). En un interesante estudio, en el que se clonaron grandes fragmentos de ADN genómico de acidobacterias no cultivadas, se determinó que las bacterias de este filo habrían adquirido genes de otras bacterias (Quaiser 2003). Distintos trabajos sugieren que la tasa de descomposición de sustratos de C provenientes de la materia orgánica en el suelo está relacionada con la proporción entre Acidobacteria y Alfaproteobacteria. El incremento en la concentración de compuestos de C conduce a una disminución relativa en la abundancia de Acidobacterias y a un aumento en la de Alfaproteobacterias (Nemergut 2010, Leff 2011). Uno de los principales factores que regula fuertemente la abundancia de Acidobacteria es el pH (Jones 2009, Lauber 2009, Rousk 2010). Se ha visto que a valores crecientes de pH la diversidad de Acidobacterias disminuye. A pesar de esta correlación, los distintos taxones que componen este filo responden de manera diferente, por ejemplo, la abundancia de los Grupos 1 y 2 aumenta considerablemente con valores de pH bajos (3-5) mientras que para el Grupo 4 aumenta con pH mayores a 5. Este efecto del pH sobre las poblaciones de bacterias no solo esta restringido al grupo de las Acidobacterias. Otros filos importantes en suelos como por ejemplo Actinobacteria y Bacteroidetes, responden a la acidez del suelo, por lo que se considera que el pH es uno de los factores más importantes que regulan la diversidad y abundancia de bacterias en los suelos (Lauber 2009).

Además de los grupos anteriormente mencionados, miembros de los grupos *Bacillus* y *Clostridium* (Filo Firmicutes) con frecuencia pueden ser detectados de muestras de suelo tanto por técnicas basadas en el cultivo como por análisis independientes de cultivo, y muchas veces su abundancia suele ser muy alta (Janssen 2008, Wang 2009). Las bacterias de este filo se caracterizan por su capacidad para formar endosporas y sobrevivir durante largos períodos de tiempo sin la necesidad de una fuente externa de carbono o energía. Una característica común de muchas de estas bacterias es la capacidad rápido crecimiento cuando están disponibles fuentes de carbono relativamente simples. Los sustratos pueden ser suministrados por las raíces en la rizosfera (Lu 2006, Li 2008), por los procesos digestivos en el intestino de los invertebrados (Czarnetzki 2004, Jensen 2003) o por residuos de plantas. Este último caso se ha visto en el rápido desarrollo de las especies de *Bacillus* termófilas en el proceso de compostaje (Peters 2000).

Principales actividades de las bacterias en el suelo y grupos relacionados

De todas las funciones que pueden cumplir las bacterias en el suelo probablemente las más importantes son aquellas relacionadas con la transformación de la materia y compuestos que son esenciales para el ciclo biológico de los elementos. La descomposición de la materia orgánica, la mineralización de nitrógeno, fósforo, azufre y compuestos conocidos como micronutrientes, son esenciales para el desarrollo de otros organismos, y en el caso de los suelos agrícolas también son importantes para los cultivos. Estos procesos son casi exclusivamente realizados por microorganismos (Coleman 2004).

Degradación de la materia orgánica

La fotosíntesis convierte el C inorgánico (CO_2) en C orgánico a través de la producción primaria bruta (PPB). Parte de este carbono se devuelve a la atmósfera como el CO_2 respirado por la planta y el resto se convierte en biomasa vegetal y se denomina producción primaria neta (PPN) (Paul 2007).

La mayor parte de la PPN, junto con los cuerpos y excreciones de animales, se devuelve al suelo como materia orgánica. Alrededor del 90% de la PPN finalmente entra en el sistema a través de plantas muertas, hojas, raíces y madera en los bosques, y a través de los residuos orgánicos en los campos agrícolas (Coleman 2004).

El proceso de descomposición conlleva complejas interacciones en la red alimenticia bajo el suelo, donde se modifican las formas químicas de los nutrientes. Este proceso es responsable de la creación de compuestos orgánicos de corta y larga vida media, importantes en la dinámica de nutrientes y la formación de la estructura del suelo. Las tasas de descomposición varían entre y dentro de los ecosistemas en distintas escalas geográficas, en función de la biota del suelo, la calidad del sustrato, el microclima y otras condiciones de los ecosistemas. La calidad de sustrato se define principalmente por la composición química de los residuos depositados sobre o en 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 ser utilizados directamente sólo por ciertos organismos especializados. La celulosa y hemicelulosa son compuestos con tasas intermedias de degradación.

La degradación en sistemas agrícolas es generalmente más rápida que en ambientes naturales, debido a que los residuos de cultivos, como regla, tienen menos componentes recalcitrantes.

Durante el proceso de descomposición, los compuestos son convertidos de formas orgánicas a inorgánicas (mineralización) y se vuelven disponibles para ser usados por plantas y microorganismos. La celulosa y hemicelulosa representan más del 50% del carbono en los desechos de plantas y ayudan a alimentar procesos microbianos como las transformaciones de nitrógeno y azufre, que poco a poco reducen la relación carbono-nitrógeno y carbono-azufre, en los materiales en descomposición.

A medida que los desechos se descomponen, la mezcla de elementos cambia. El carbono se pierde por la respiración microbiana, y la celulosa y otros compuestos lábiles son hidrolizados y utilizados para el crecimiento y mantenimiento celular. El nitrógeno es mineralizado y simultáneamente inmovilizado por los microorganismos, resultando en un incremento de la concentración de N en el sistema, y en un aumento de la cantidad absoluta si es transportado desde el suelo o por fijación atmosférica. A medida que avanza la descomposición, la proporción de carbono-nitrógeno declina hasta que el sustrato se hace más adecuado para la actividad microbiana.

Junto con otros factores como la disponibilidad de sustratos, la competencia, y factores ambientales, el perfil de enzimas degradativas y generales de las bacterias del suelo determina la gama de sustratos que pueden utilizar. Debido al tamaño de muchos sustratos (ej. lignina, celulosa) la mayoría de la depolimerización es extracelular, y sólo el último paso, donde se utilizan las moléculas más pequeñas es intracelular. En la Tabla 1.2 pueden verse algunos ejemplos de enzimas relacionadas con la degradación de sustratos. En muchos casos, se trata de una serie de enzimas, y no solo una la que actúa sobre el sustrato.

Celulosa. La descomposición de la celulosa es una actividad clave de las bacterias del suelo y es vital para el flujo de energía a través de los suelos y los ciclos del N, P y S. En términos sencillos, la descomposición de la celulosa es una despolimerización relativamente especializada (con un número restringido de saprófitos) seguida por una hidrólisis simple a glucosa, que es rápidamente utilizada como fuente de energía por la mayoría de los microorganismos heterótrofos del suelo. El complejo enzimático celulasa, que cataliza la descomposición de

Enzimas degradativas para la utilización de sustratos orgánicos	Distribución de enzimas y ejemplos de bacterias del suelo con actividad ecológicamente significativa de estas enzimas
Celulasas (Celulosa => Glucosa)	Especies de *Bacillus, Cellulomonas,* y *Pseudomonas*
Glucosa oxidasas (Glucosa => CO_2)	Enzimas ubicuas de bacterias de suelo
Proteasas (Proteínas => Amino ácidos)	Extendidas entre los procariotas del suelo, pero las especies de *Pseudomonas* y *Flavobacterium* son fuertemente proteolíticas
Deaminasas/Amino transferasas; amino-ácido decarboxilasas (Remocion de grupos amino y carboxilo para liberar NH_3 y CO_2 de los amino ácidos)	Enzimas más comunes que las proteasas, aunque con diferentes tasas entre amino-ácidos
Ureasas (Urea => amonio + dióxido de carbono)	Aproximadamente el 50% de las bacterias heterotróficas son ureolíticas
Amilasas y glucosidasas (almidón => glucosa)	Especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Chromobacterium*
Ligninasa (Lignina => subunidades aromáticas)	Aunque la degradación de lignina es principalmente realizada por hongos, especies de *Arthrobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* también están involucradas
Pectinasas (Pectina => subunidades del acido galacturónico)	Especies de *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (algunas especies poseen todas las enzimas pectinasa, poligalacturonasa, pectato liasa, pectina liasa y pectinaesterasa). Muchos patógenos vegetales poseen pectinasa para ayudar en la penetración de la planta hospedera
Fosfatasas (Esteres de fosfato => fosfato)	Aproximadamente el 30% de las bacterias heterotróficas del suelo poseen fosfatasas
Sulfatasas (Esteres de sulfato => sulfato)	Muy pocos poseen sulfatasas
Invertasas (Sucrosa => fructosa + glucosa)	Particularmente activas en bacterias saprotróficas del suelo, como *Acinetobacter* y *Bacillus*
Quitinasas (Quitina => subunidades de aminoazúcares)	Las actinobacterias *Streptomyces* y *Nocardia*
Amino-ácido decarboxilasas	Tanto amino-ácido decarboxilasas aromáticas y no aromáticas se encuentran en una amplia gama de bacterias del suelo

Tabla 1.2: Ejemplos de enzimas y bacterias asociadas a la utilización de sustratos orgánicos (Paul 2007).

celulosa, se encuentra en un gran número de bacterias celulolíticas (ej.: especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Clostridium*) y hongos. Aunque las vidas medias de la celulosa y la hemicelulosa en el suelo son del orden de días o semanas, el metabolismo de la glucosa después de la despolimerización de la celulosa es extremadamente rápido (Lednická 2000, Lynd 2002, Wirth 2002).

El término hemicelulosa describe diversos azúcares (hexosas y pentosas) y polímeros de ácidos urónicos que, como la celulosa, se descomponen por un proceso de despolimerización relativamente especializado, seguido por una asimilación y oxidación más rápida del monómero simple. La pectina, un polímero de subunidades de ácido galacturónico, es un buen ejemplo de esto, con bacterias pectinolíticas tales como especies de *Streptomyces* y *Arthrobacter* que producen pectino despolimerasas extracelulares (exo-y endo-) y luego con una gama mucho más amplia de microorganismos heterótrofos que utilizan la enzima ácido galacturónico-oxidasa para explotar la energía almacenada en el compuesto resultante (Lavelle 2003).

Lignina. Después de la celulosa, la lignina es la segunda sustancia orgánica más abundante producida durante la PPN. La lignina es un polímero complejo, denso y amorfo de la pared celular secundaria que se encuentra en elementos de las tráqueas y el esclerénquima de las plantas terrestres. La naturaleza densa, hidrofóbica, y sin estructura específica de la lignina hacen que sea difícil de atacar para las enzimas. Se cree que la lignina debe romperse en fragmentos más pequeños antes de que la descomposición entre en proceso. La despolimerización de la lignina produce un producto soluble en agua, precipitable no muy diferente de los ácidos húmicos del suelo. Las bacterias Gram negativas *Pseudomonadaceae*, *Azotobacter*, y *Neisseriaceae* y los actinomicetes *Nocardia* y *Streptomyces*, pueden degradar la lignina, pero no en la misma medida que los hongos. No ha sido bien establecido si las bacterias pueden causar la descomposición completa y utilizar cualquier C de la lignina para su crecimiento (Tuomela 2000, Paul 2007).

Ciclo del Nitrógeno

Ningún otro elemento esencial para la vida toma tantas formas en el suelo como el N, y las transformaciones entre estas formas son en su mayoría mediadas por microorganismos. La microbiología del suelo, por lo tanto, juega un papel crucial en el funcionamiento de los

ecosistemas: En la mayoría de los ecosistemas terrestres el N limita el crecimiento de las plantas, y por lo tanto la PPN puede ser regulada por las tasas a las que los microorganismos transforman el N en formas utilizables para las plantas. Sin embargo, varias formas de N también son contaminantes, por lo que las transformaciones microbianas del N en el suelo también afectan la salud humana y ambiental. Entender las transformaciones de N como a los microorganismos que las realizan, es esencial para la comprensión y el manejo de la salud del ecosistema y la productividad. La fijación de N biológico, es decir la transformación del N_2 en N orgánico, es el proceso dominante mediante el cual el N entra al ciclo biológico del suelo. Luego existen numerosas transformaciones que afectan la disponibilidad de N para las plantas y otros organismos, y en su mayoría estas transformaciones son llevadas a cabo por los microorganismos del suelo.

Mientras los microorganismos del suelo consumen los detritos para utilizarlos principalmente como fuente de energía y carbono necesarios para su crecimiento, también tienen una necesidad de nutrientes, especialmente N, para ensamblar proteínas, ácidos nucleicos, y otros componentes celulares.
Si los detritos vegetales son ricos en N, las necesidades microbianas son fáciles de cubrir y, procede la liberación de N, o la mineralización. En cambio, si los detritos vegetales son bajos en N, los microorganismos necesitan N adicional de su entorno, tomándolo o inmovilizándolo en su biomasa. A veces los detritos no tiene suficiente N para satisfacer las necesidades microbianas, así que a medida que el C se consume, el N es retenido por los microorganismos y aún más N debe ser inmovilizado desde el suelo. La mineralización y la inmovilización son llevadas a cabo por una amplia gama de microorganismos (bacterias aerobias, anaerobias y hongos).

Fijación Biológica de Nitrógeno. La fijación biológica de Nitrógeno (FBN) es un proceso exclusivamente restringido a los procariotas. Las bacterias que utilizan N_2 como única fuente de N se llaman diazótrofas. Aunque sólo un número limitado de especies bacterianas fijan N_2, estas representan una amplia variedad filogenética y fisiológica que ocupan diferentes nichos ecológicos (Paul 2007) (Tabla 1.3).
Los organismos diazótrofos utilizan diversas fuentes de energía incluyendo la luz del sol (fotótrofos), elementos y compuestos inorgánicos reducidos (litótrofos), y una plétora de diferentes sustratos orgánicos (heterótrofos). Están representados por aerobios obligados y

facultativos y anaerobios obligados. Esta diversidad metabólica indica que los diazótrofos pueden contribuir con la fijación de N a otras formas de vida en una amplia variedad de ambientes.

Fuente de energía	Sensibilidad de la fijación de N_2 al oxigeno	Ejemplos (Géneros)
Heterótrofos	Diazótrofos aeróbicos	*Azotobacter, Gluconacetobacter*
	Diazótrofos microaróﬁlos	*Azozpirillum, Herbaspirillum, Methylococcus*
	Diazótrofos aeróbicos facultativos	*Klebsiella, Paenibacillus, Enterobacter*
	Diazótrofos anaeróbicos obligados	*Clostridium, Desulfovibrio, Methanosarcina*
Fotótrofos	Diazótrofos aeróbicos	*Anabaena, Nostoc*
	Diazótrofos microarofilos	*Lyngbya, Oscillatoria*
	Diazótrofos aeróbicos facultativos	*Rhodobacter*
	Diazótrofos anaeróbicos obligados	*Chromatium*

Tabla 1.3: Ejemplos de géneros de bacterias diazótrofas ordenados según la fuente de energía que utilizan y la sensibilidad al oxígeno.

Bacterias Fijadoras de vida Libre. Los procariotas diazotróficos se pueden dividir en aquellos que llevan a cabo FBN en una relación simbiótica o de comensalismo con un eucariota y las que fijan N_2 en un estado de vida libre.

Debido a que el factor principal que limita por lo general la FBN es la fuente de energía (C), es razonable predecir que los diazótrofos fotosintéticos de vida libre pueden fijar una mayor cantidad de N_2 bajo ciertas condiciones del suelo, a diferencia de los heterótrofos de vida libre. Estos fijarán mayores cantidades de N_2 sólo en presencia de compuestos de C derivados de plantas fácilmente disponibles, por ejemplo, C lábil en la zona rizosférica de una planta en crecimiento activo, o durante la descomposición de los residuos de plantas herbáceas y leñosas de alta relación C:N.

Las bacterias diazotróficas facultativas y anaeróbicas obligadas se encuentran a menudo en la madera en descomposición, donde los hongos celulolíticos y ligninolítico despolimerizan los azúcares y los compuestos fenólicos necesarios para el crecimiento de los diazótrofos. Una situación similar existe en los residuos agrícolas, en los que se ha visto que la adición de bacterias celulolíticas y diazotróficas mejoran la BNF y aceleran la descomposición de los desechos deficientes en N (Pariona-Llanos 2010, Werner 2005).

Bacterias Fijadoras Asociativas. Las secreciones de las raíces y otros compuestos rizosféricos son fuentes importantes de C que entran al suelo desde la planta, y las bacterias diazotróficas utilizan estos recursos al asociarse con las raíces de las plantas (Gnanamanickam 2006). Muchos estudios demostraron que una variedad de bacterias diazotróficas se asocian con las raíces de las gramíneas tropicales, en particular las especies *Paspalum* y *Digitaria*, donde se fijan grandes cantidades de N_2. Estas bacterias pertenecen al género *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, y *Burkholderia*. Se encuentran tanto en la rizosfera como en los espacios intercelulares de la corteza de la raíz (Mano 2008).

Bacterias Fototróficas. Debido a que el FBN es un proceso energéticamente costoso, no es de extrañar que los microorganismos fotosintéticos sean los principales proveedores de N fijado en determinados ecosistemas del suelo. En los campos de arroz, por ejemplo, las cianobacterias y otras bacterias fotosintéticas aportan importantes cantidades de N, debido a las condiciones de suelo inundado a principios de la temporada de cultivo, la presencia de abundante luz, la fertilización adecuada con P, y las bajas condiciones de O_2 que se encuentra en la interfase sedimento-agua.

Bacterias Simbióticas. La mayor parte de las simbiosis terrestres asociadas a la fijación de N_2 implica un fijador de N_2 procariota y un hospedador fotosintético. Debido a que el procariota obtiene su energía de la máquinaria fotosintética, el costo energético de la FBN se compensa adecuadamente, y cantidades considerables de N pueden ser fijadas, si otros factores no son limitantes. En los agroecosistemas, una leguminosa perenne de manejo intensivo, como la alfalfa (*Medicago sativa*), puede fijar varios cientos de kilogramos de N por hectárea por año. Las leguminosas son las más reconocidas simbiosis fijadoras de N_2 debido a su importancia como fuente de alimento.

En 1886, Hellreigel y Willfarth demostraron la capacidad de las leguminosas para convertir N_2 en N orgánico. Rápidamente a partir de entonces, Beijerinck en 1888 aisló bacterias (rizobios) a partir de nódulos de las raíces de leguminosas y demostró que eran capaces de reinfectar la planta, formar nódulos y fijar N_2 en la simbiosis. Estudios llevados a cabo en la primera parte del siglo 20 mostraron que los rizobios recuperados de nódulos de las raíces de diferentes especies de leguminosas expresan diferentes características fenotípicas y su especificidad por la planta huésped. Hoy en día sabemos que los rizobios se clasifican en varios géneros y especies dentro de la clase Alfaproteobacteria. En el caso de la soja las bacterias del genero *Bradyrhizobium* son los simbiontes principales de la especie. Estas bacterias, en particular distintas cepas de especies como B. *japonicum* y *B. elkanii* son utilizadas como inoculantes y en esos casos pueden aportar entre el 60% y 90% del N total utilizado por la planta (Werner 2005).

Bacterias Nitrificantes Autotróficas. La nitrificación es la oxidación microbiana de formas reducidas de nitrógeno a formas menos reducidas, principalmente nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Ahora sabemos que los microorganismos heterótrofos también pueden nitrificar, a pesar que la nitrificación autotrófica parece ser el proceso dominante en la mayoría de los suelos (Bothe 2000).

La importancia de los nitrificantes para el funcionamiento del ecosistema es sustancial: aunque algo de nitrato entra al ecosistema como fertilizante, en la mayoría de los ecosistemas el nitrato se forma *in situ* a través de la nitrificación. La nitrificación autotrófica es un proceso en dos etapas, llevadas a cabo por grupos separados de bacterias: Las oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito, respectivamente. Los nitrificantes autótrofos obtienen su C del CO_2 o carbonatos, y son aerobios obligados.

Hasta el 80% de la energía producida durante la nitrificación se genera a través del ciclo de Calvin; por ende, las eficiencias de crecimiento de los nitrificantes son correspondientemente bajas. Esto explica en parte, su poca capacidad para competir con los heterótrofos y las plantas, por el amonio en muchos suelos.

Estudios basados principalmente en el gen del ARNr 16S y análisis de secuencias genéticas colocan a los grupos de oxidantes de amonio en la clase Betaproteobacterias, con excepción de algunos géneros que se ubican entre las Gammaproteobacteria, como *Nitrosococcus*. De los oxidantes del amonio hasta ahora aisladas de suelo, todos pertenecen al grupo de Betaproteobacteria.

En los suelos agrícolas, las *Nitrosomonas communis* con cepas multiformes *Nitrosolobus* son numéricamente dominantes. Los suelos no fertilizados por lo general también contienen cepas de *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosospira* y *Nitrosovibrio* (Koops 2001).

Las bacterias oxidantes de nitrito aparecen en una gama más amplia de grupos filogenéticos que las oxidantes del amonio, pero solo los géneros *Nitrobacter* y *Nitrospira* (Freitag 2005) se han detectado en suelos. La distribución de los otros géneros de oxidantes de nitrito (*Nitrosococcus* y *Nitrospina*) no se conoce totalmente (Koops 2001). Los miembros de *Nitrobacter* forman un exclusivo y altamente relacionado grupo en Alfaproteobacteria. Estimaciones de distancia evolutiva los sitúan con menos del 1% de diferencia, lo que indica poca diversidad genética dentro del grupo. Los otros géneros de oxidantes de nitrito se encuentran en las subclases delta (*Nitrospina* y *Nitrospira*) y gamma (*Nitrosococcus*) de las Proteobacterias (Ahn 2000).

Bacterias Nitrificantes Heterotróficas. Una amplia variedad de bacterias heterótrofas y hongos tienen la capacidad de oxidar amonio (NH_4^+). La denominada nitrificación heterótrofa no está relacionada con el crecimiento celular, como sucede para la nitrificación autótrofa (Kuenen 1994). Existe evidencia de solo dos rutas para la oxidación del amonio por heterótrofos. La primera, se encuentra en bacterias, y es similar a la oxidación autotrófica, en que las bacterias nitrificantes tienen similares enzimas oxidantes de amonio (e hidroxilamina).

Estas enzimas pueden oxidar diferentes sustratos, y puede ser que la oxidación del amonio sea sólo secundaria al propósito principal de estas enzimas de oxidar propeno, benceno, ciclohexano, metanol, fenol, o muchos de otros compuestos orgánicos no polares.

Se ha encontrado que bacterias heterotróficas como *Arthrobacter globiformis*, *Aerobacter aerogenes*, *Thiosphaera pantotropha*, *Streptomyces grisens*, y varias especies de *Pseudomonas* son capaces de nitrificar (Lin 2010, Robertson 1990, Zhang 2011). La nitrificación heterotrófica parece importante en algunos suelos y en algunos microambientes en los que los nitrificantes autótrofos son químicamente inhibidos. Sin embargo, se cree que rara vez son dominantes en la comunidad nitrificante del suelo.

Bacterias Desnitrificantes. La desnitrificación es la reducción de los nitratos del suelo a las formas gaseosas óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y N_2. Una amplia variedad de bacterias en su mayoría heterótrofas pueden desnitrificar, utilizando el NO_3^+ en lugar de oxígeno (O_2) como aceptor final de electrones durante la respiración (Cavigelli 2000, Philippot 2005).

Debido a que el nitrato es un aceptor de electrones menos eficiente que el O_2, la mayoría de las bacterias desnitrificantes lo utilizan en ausencia de O_2. En la mayoría de los suelos esto ocurre cuando la lluvia satura los poros del suelo de agua y disminuye drásticamente la difusión de O_2 en los micrositios.

La desnitrificación se lleva a cabo por una amplia gama de bacterias del suelo, incluyendo organotrofos, quimio y fotolitotrofos, fijadoras de N_2, termófilos, halófilos y distintos patógenos. Se han identificado más de 50 géneros con más de 125 especies desnitrificantes. En el suelo, la mayoría de bacterias desnitrificantes cultivables son anaerobios facultativos pertenecientes a sólo seis géneros, principalmente *Pseudomonas* y *Alcaligenes* y, en menor medida *Bacillus*, *Agribacterium* y *Flavibacterium*. Típicamente las bacterias desnitrificantes constituyen entre el 0,1 a 5% de la población del suelo cultivable total y hasta un 20% de la biomasa microbiana total (Paul 2007).

Transformación del Fósforo

Los microorganismos del suelo tienen un profundo efecto sobre las transformaciones implicadas en un gran número de ciclos biogeoquímicos distintos del C y N; tales como el fósforo y el azufre, y diversos micronutrientes y contaminantes. El N y el P son los elementos que más a menudo limitan la productividad biológica. Mientras que la principal fuente de N proviene de la atmósfera, el P es principalmente derivado de la roca, lo que restringe severamente su tasa de entrada y lo hace un elemento agotable. En suelos altamente meteorizados, donde el P ya no se suministra de la materia parental, la deposición de polvo puede representar la mayor entrada de P al suelo (Vitousek 2004).

El P en compuestos orgánicos no está directamente disponible para los organismos porque no puede ser absorbido en las células en esta forma. Para que ocurra la captación celular, primero debe ser liberado de la molécula orgánica a través de su mineralización. La etapa final en la conversión de P orgánicamente ligado en fosfato inorgánico se produce a través de la acción de las enzimas fosfatasas. El grupo de las enzimas fosfatasas incluye enzimas fitasas que catalizan la liberación de fosfato a partir de fitina y nucleasas que liberan fosfato de los ácidos nucleicos. Estas enzimas son producidas por hasta el 70-80% de la población microbiana, incluyendo bacterias como *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Serratia* spp, *Proteus* spp., *Arthrobacter* spp., y *Streptomyces* spp. Una vez que se mineraliza el P, puede ser tomado por las plantas,

inmovilizado por la biomasa microbiana, precipitar en complejos inorgánicos, o ser adsorbido en las superficies minerales.

Transformación del Azufre

El último compuesto considerado fundamental para la vida es el azufre. En el ciclo del S en los suelos, también intervienen de forma activa los microorganismos. El ciclo del S es similar al del N, y a diferencia del P, este elemento sufre transformaciones químicas mediadas por microorganismos que conducen a su volatilización. Varias reacciones clave del ciclo son aceleradas, y en ocasiones completamente controladas por actividad microbiológica. La biomasa microbiana del suelo actúa como la fuerza impulsora detrás de la mineralización-inmovilización y transformaciones de oxidación-reducción del S.

El S unido a C se mineraliza a través de diversas vías: (1) La mineralización aeróbica directa durante la oxidación de C como una fuente de energía; (2) la mineralización anaeróbica de materia orgánica (desulfuración); (3) la oxidación incompleta de S orgánico en compuestos inorgánicos; (4) la oxidación biológica de ácido sulfhídrico (H_2S); (5) la oxidación biológica de tetrationato a sulfato vía sulfuro; (6) la hidrólisis de la cisteína por la cisteína desulfidrolasa y (7) la mineralización indirecta (enzimática) cuando ésteres de sulfato son hidrolizados por sulfatasas.

Micronutrientes y elementos traza

Los micronutrientes son los elementos químicos que son requeridos por las plantas y los microorganismos en cantidades pequeñas. Estos micronutrientes son componentes vitales de las enzimas u hormonas de crecimiento. Los elementos traza esenciales para las plantas son el hierro (Fe), cinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo), y níquel (Ni).

Los microorganismos y los animales superiores también requieren cobre (Cu), cobalto (Co), cromo (Cr), selenio (Se), y estaño (Sn). Otros elementos metálicos, tales como mercurio (Hg), arsénico (As), plomo (Pb) y cadmio (Cd) no son esenciales para los organismos, pero se encuentran en los suelos como contaminantes.

Las concentraciones de elementos como iones libres o complejos solubles están fuertemente influenciadas por las reacciones abióticas, tales como cambios en el estado de oxidación, la fijación a las superficies minerales, formación de complejos con la materia orgánica, y la

formación de minerales insolubles. Los microorganismos son capaces de solubilizar minerales y cambiar el potencial redox del suelo y el pH. Por lo tanto, la disponibilidad de micronutrientes para las plantas depende en gran medida de la actividad microbiana. En las tablas 1.4 y 1.5 pueden verse algunos ejemplos de reacciones químicas que involucran micronutrientes y cuales son algunas de las bacterias capaces de realizarlas.

Elemento	Reacción	Estrategia	Ejemplo
Fe	$2Fe^{2+} \rightarrow 2Fe^{3+} + 2e^-$	E	*Acidithiobacillus ferrooxidans*
Mn	$Mn^{2+} \rightarrow Mn^{4+} + 2e^-$	E, D	*Arthrobacter, Pseudomonas*
Hg	$Hg^0 \rightarrow Hg^{2+} + 2e^-$	NE	*Bacillus, Pseudomonas*
As	$AsO_2^- \rightarrow AsO_4^{3-} + 2e^-$	D	*Bacillus, Pseudomonas, Alcaligenes faecalis*
Se	$Se^{2+} \rightarrow Se^0 + 2e^-$	E	*Bacillus, Acidithiobacillus*
U	$U^{4+} + 2e^- \rightarrow U^{6+}$	E	*Acidithiobacillus ferrooxidans*

Tabla 1.4: Reacciones de oxidación de metales en suelos y sedimentos mediadas por microorganismos y ejemplos de los organismos involucrados. NE: No enzimática, D: Detoxificación y E: Fuente de energía.

Elemento	Reacción	Estrategia	Ejemplo
Fe	$2Fe^{3+} + 2e^- \rightarrow 2Fe^{2+}$	AR	*Geobacter, Desulfovibrio, Pseudomonas, Acidithiobacillus*
Mn	$Mn^{4+} + 2e^- \rightarrow Mn^{2+}$	AR	*Geobacter, Shewanella, Desulfovibrio, Pseudomonas*
Hg	$Hg^{2+} + 2e^- \rightarrow Hg^0$	D	*Pseudomonas, Streptomyces; Bacillus, Vibrio, Alcaligenes*
Se	$SeO_4^{2-} + 8\ e^- \rightarrow Se^{2-}$	AR	*Pseudomonas, Flavobacterium, Citrobacter, Clostridium*
Cr	$Cr^{6+} + 3\ e^- \rightarrow Cr^{3+}$	AR, D	*Pseudomonas, Aeromonas, Clostridium, Citrobacter, Bacillus*
U	$U^{6+} + 2e^- \rightarrow U^{4+}$	AR	*Geobacter metallireducens, Shewanella putrefaciens*

Tabla 1.5: Reacciones de reducción de metales en suelos y sedimentos mediadas por microorganismos y ejemplos de los organismos involucrados. AR: El elemento es el aceptor final de electrones en la respiración aeróbica y D: Detoxificación.

Aunque la diversidad filogenética de los microorganismos puede ser mucho mayor que lo que sabemos hasta ahora, es poco probable que la diversidad metabólica de los microorganismos por descubrir aumente de manera similar. A pesar que la oxidación anaeróbica del metano se postuló durante mucho tiempo sobre la base de datos biogeoquímicos (Barnes 1976) y consideraciones teóricas, los microorganismos implicados en la oxidación anaeróbica del metano no habían sido descubiertos si no hasta hace unos años (Nauhaus 2002, Krüger 2003). Del mismo modo, no hace mucho tiempo que fue descripta la oxidación anaeróbica del amonio (anammox) con nitrito como aceptor de electrones en las aguas residuales (Mulder 1995) y ambientes marinos (Dalsgaard 2003, Strous 2004).

Otras vías relativamente nuevas son el proceso de corrosión anaeróbica de sulfato por reductores adjuntos a superficies, capaces de utilizar directamente los electrones de la oxidación del hierro elemental a Fe (II) (Dinh 2004), y la oxidación anaeróbica del hierro por bacterias fototróficas (Widdel 1993) y reductoras de nitrato (Straub 1996, Ratering 2001).

Sin embargo, es probable que unas pocas nuevas vías metabólicas que son termodinámicamente factibles se descubran tarde o temprano. Una de ellas es la oxidación anaeróbica de amonio, posiblemente con Mn (IV) como aceptor de electrones.

El ambiente agrícola

Los sistemas de cultivo se caracterizan por diferentes métodos de manejo (con labranza, siembra directa o labranza cero, con o sin riego, etc.), por diferente intensidad (aplicación de plaguicidas, la frecuencia y dosis de fertilización mineral y orgánica), y por la frecuencia de cultivos diferentes (duración de la fase de cultivo como un porcentaje de la duración total del ciclo de cultivo). Esto significa que existe una amplia gama de sistemas de cultivo diferentes.

Los sistemas de labranza del suelo se pueden clasificar en labranza convencional (labranza con arado), labranza reducida (también llamada mínimo laboreo) y siembra directa (siembra directa sin labranza).

La labranza convencional se realiza con un arado, que da vuelta el suelo en una profundidad de alrededor de 25 a 30 cm. Este sistema de labranza conduce a una mezcla intensiva de los suelos con materia orgánica y los residuos orgánicos del campo (raíces, paja, rastrojos, estiércol). Además, la labranza convencional conduce a un efectivo control mecánico de malezas, así como a un aflojamiento intensivo del suelo. El último efecto mencionado induce un aumento de la

mineralización de la materia orgánica que conduce a un aumento de minerales disponibles (generalmente nitrato). Uno de los problemas principales en los sistemas convencionales de labranza es que tienden a aumentar la erosión. Después de arar, la superficie del suelo no está cubierta con residuos vegetales y no está protegida contra la erosión. Para mitigar este efecto negativo sobre el suelo, la labranza reducida fue introducida en los sistemas agrícolas. La labranza reducida puede cambiar muchas propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Gran número de estudios de campo se han llevado a cabo para determinar los efectos de diferentes prácticas de labranza en la fertilidad del suelo (Beyaert 2002, Mozafar 2000).

Los sistemas de labranza reducida y siembra directa dan lugar a que más residuos de plantas cubran y protejan la superficie del suelo. Por esa razón los suelos en que se realiza este tipo de manejo tienen mejores condiciones para aumentar las poblaciones de lombrices. Otro efecto está relacionado a los cambios en el contenido de nutrientes (Ej. potasio y nitrógeno) en el suelo. A largo plazo se ha traducido en mayor contenido de nitrógeno en el suelo (Yin 2002).

Además, existen evidencias que indican un uso más eficiente de la humedad y mejoras en las propiedades del suelo relacionadas con la siembra directa (Tabla 1.6). La siembra directa y el sistema de labranza reducida permiten un aprovechamiento más eficiente de las precipitaciones en la producción agrícola. Sin embargo, también se ha sugerido que este tipo de manejo agrícola aumenta la resistencia mecánica del suelo, lo que puede retrasar el desarrollo de raíces y aumentar el estrés hídrico si se presentan condiciones de sequía al comienzo de la temporada de crecimiento (Beyaert 2002).

Característica	**Labranza**	
	Convencional	Reducida
Población de lombrices	-	+
Erosión	+	-
Estructura y fertilidad del suelo	-	+
Infiltración de agua	+	-
Evaporación	+	-
Contenido de materia orgánica	+	-
Infección con hongos patógenos	+	-
Densidad de malezas	-	+

Tabla 1.6: Efectos generales de los sistemas de labranza convencional y reducida.

Un importante efecto no deseado de estos sistemas se centra en la población y la densidad de malezas. La siembra directa y los sistemas de labranza reducida conducen a un mayor número de especies vegetales de ciclo corto (la mayoría de las especies monocotiledóneas), así como especies de ciclo largo (la mayoría de las especies dicotiledóneas) de la población de malezas. En general se puede concluir que los sistemas de reducción de labranza requieren una mayor frecuencia en la aplicación de herbicidas (Triplett 2008).

Otro efecto negativo de los sistemas de labranza reducida consiste en infecciones con enfermedades de las plantas como *Fusarium* sp., *Pseudocercosporella herpotrichoides*, *Gaeumannomyces graminis*, y *Helminthosporium tritici repens*, que son importantes patógenos en el cultivo de cereales. Estos hongos patógenos sobreviven en los residuos vegetales que cubren la superficie del suelo. En sistemas de labranza reducida y siembra directa estos residuos de las plantas, que están infectados con los hongos, no se incorporan en el suelo. Por esta razón los agentes patógenos tienen condiciones favorables para su desarrollo y reproducción.
A pesar de los efectos negativos antes mencionados, los sistemas de labranza reducida están muy extendidos y bien aceptados en los cultivos. Esto se debe también al mayor interés en la reducción de la labranza y sistemas de labranza cero, que es el resultado de la necesidad de conservar energía, reducir la erosión del suelo, y mejorar la rentabilidad de las explotaciones.

En la mayoría de las regiones cultivables de todo el mundo, los sistemas se caracterizan por un sólo cultivo y sólo una variedad en el mismo campo durante el mismo período. Esto ocurre, por ejemplo, en el cultivo de trigo, cebada, centeno, colza, linaza, maíz, soja, sorgo, guisante, y caña de azúcar. Por esta razón, dentro de un campo la diversidad de los cultivos es muy baja. Contrariamente a las plantas cultivadas, con poblaciones homogéneas anuales o bianuales, en la naturaleza se encuentran, principalmente poblaciones de plantas perennes con una gran diversidad. Esta situación de desventaja en el cultivo tiene que ser compensada por la rotación sistemática de los cultivos en los campos de producción. Por eso, la rotación de cultivos es una herramienta muy importante en el manejo del cultivo en tierras agrícolas, que puede influir en los rendimientos, así como en la calidad de los productos de las plantas cultivadas.
El término "rotación de cultivos" se define como una rotación sistemática de los cultivos en el mismo campo y con una duración limitada en el tiempo. La alternancia de cultivos se lleva a cabo año tras año. Dependiendo de la región, existe una amplia gama de diferentes rotaciones. El

tipo y diversidad de estas rotaciones de cultivos depende de las condiciones edafológicas y climáticas, así como de los sistemas de cultivo, técnicas y costos. La diversificación de los sistemas de cultivo trae como consecuencia muchos efectos en las características de los suelos (físicos, químicos, microbiológicos), sobre la dinámica de los nutrientes, el crecimiento de las plantas, y en el medio ambiente. Estos efectos se pudieron observar en distintos experimentos de campo realizados bajo diferentes climas y condiciones de suelos (Gesch 2005).

La diversificación de los sistemas de cultivo puede dar lugar a mayores rendimientos de los cultivos influyendo sobre las enfermedades de las plantas, las malezas, la distribución de la raíz, la utilización de la humedad y disponibilidad de los nutrientes (Grant 2002). También puede alterar el patrón y el grado de eliminación de nutrientes. Mayores cantidades de residuos de los cultivos que regresan a la tierra pueden aumentar la reserva de C orgánico del suelo y pueden llevar a un mayor potencial para el reciclaje de nutrientes, efecto que se incrementará con el tiempo (Campbell 2000, Grant 2002). Este efecto sobre el contenido de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes, se puede incrementar mediante la reducción del sistema de labranza y la inclusión de leguminosas en la rotación de cultivos.
En los sistemas de rotación de cultivos también se ve una disminución en los efectos negativos producto de la presencia de patógenos. A diferencia, en los monocultivos, de una cosecha a la siguiente permanecen los rastrojos de la misma especie cultivada y con ellos agentes específicos causantes de enfermedades, que no son eliminados y se encuentran listos para propagarse en la siguiente generación. Por lo tanto, la rotación de cultivos impide que estos patógenos puedan prosperar al enfrentarse a distintos especies a las cuales no pueden infectar.

En resumen, la tendencia actual hacia el agotamiento de los recursos naturales ha llevado a un creciente reconocimiento de la necesidad de modelos alternativos de agricultura basada en sólidos principios para sostener la creciente demanda de alimentos con el mínimo impacto sobre el medio ambiente. La Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) (http://www.fao.org/ag/ca) ha establecido un nuevo paradigma en las prácticas sostenibles a través de la aplicación de tres principios de la agricultura de conservación: mínima perturbación mecánica del suelo, permanente cobertura orgánica del suelo y rotación diversificada de cultivos (Gowing 2008)

Los microorganismos en el ambiente agrícola

Como se indicó anteriormente, la biodiversidad de los procariotas, junto a su versatilidad metabólica es uno de los factores clave que contribuyen a la sostenibilidad de los suelos en los agroecosistemas. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta la biodiversidad de los procariotas como un parámetro importante para evaluar el impacto ecológico de la agricultura en los suelos.
Como la definición de especies y grupos en los procariotas es más arbitraria que ecológicamente significativa, no hay una escala fija en la que este tipo de estudios de impacto deba llevarse a cabo.

En raras ocasiones es posible vincular una cierta diversidad de especies con una función agrícola. Sin embargo un ejemplo destacado son los rizobios formadores de nódulos y las leguminosas. Diferentes especies de este grupo pueden provocar la formación de nódulos en raíces de diferentes especies de leguminosas y distintas cepas pueden ser diferenciadas dentro de una sola especie de *Rhizobium*. Otro ejemplo es el de las bacterias oxidantes de amonio en los suelos, las cuales en algunos casos responden con cambios en su diversidad a diferentes condiciones de manejo agrícola (Bruns 1999, Phillips 2000).
Sin embargo, para la mayoría de los procariotas del suelo, tales vínculos directos entre una especie o grupo y una propiedad agrícola determinada no pueden ser establecidos.

En estudios ecológicos, un catálogo de las diferentes especies en un entorno determinado no puede ser un objetivo, sino más bien una herramienta, que ayuda a comprender las interacciones y dependencias de diferentes organismos entre sí o con los parámetros ambientales. Para los organismos superiores (por ejemplo, los miembros de la mesofauna del suelo), una especie o un grupo taxonómico se puede asociar con cierta frecuencia a parámetros funcionales. Por ejemplo, ciertos colémbolos mejoran la descomposición de materia orgánica en la capa de detritos o las lombrices transportan sustratos orgánicos en las capas más profunda del suelo y aumentan el número de macroporos. Con los procariotas del suelo, sin embargo, la situación es diferente: En la mayoría de los casos, los vínculos directos entre una especie y una función ecológica no puede ser establecida. La mayoría de las funciones ecológicas del suelo son realizadas por muchas especies en diferentes grupos filogenéticos. La degradación de la celulosa, por ejemplo, es un proceso importante en el ciclo del carbono, y las bacterias con las celulasas se pueden encontrar en muchos filos (ej. Actinobacteria, Bacteriodetes, Proteobacteria o Firmicutes) (Ulrich 1999).

Esto sucede tambien para las bacterias desnitrificantes o fijadoras de nitrógeno (Zehr 2003). Las bacterias oxidantes de amonio en el suelo, sin embargo, son probablemente una excepción. Sólo miembros de dos géneros, *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*, ambos pertenecientes al grupo de Betaproteobacteria, se han encontrado como oxidantes de amonio en el ecosistema terrestre (Bäckman 2003, Prosser 2002), aunque no se descarta que en el futuro se encuentren otros microorganismos (por ejemplo, de grupos aún no cultivados) también capaces de oxidar amonio en el suelo.

La diversidad de una comunidad microbiana, así como las funciones dentro de esa comunidad, afectan la estabilidad y la resiliencia del suelo (la capacidad del suelo de recuperarse después de una perturbación (Elliott y Lynch, 1994)). Ni un grado más alto ni más bajo de diversidad en un sistema puede decirse que sea mejor o peor, sin embargo, los cambios en la actividad o la estructura de la comunidad pueden influir en la calidad del suelo (Collins 1999).

Indicadores biológicos

Desde el comienzo de la década del 80, se ha observado una disminución en la capacidad productiva de los suelos en más del 10% de las tierras cultivadas en todo el mundo, como resultado de la erosión del suelo, la contaminación atmosférica, el pastoreo excesivo, la salinización y la desertificación (Bloem 2006).

A pesar de varias propuestas internacionales, entre ellas la publicada por la *Soil Science Society of America* (SSSA), un conjunto definitivo de indicadores básicos para la evaluación de la calidad del suelo todavía no ha sido elaborado. Esto se debe principalmente a la continua dificultad en definir la calidad del suelo y cómo evaluarla. En los últimos años se han sugerido muchas definiciones, pero tal vez la que mejor representa el concepto fue dada por Doran y Parkin (1994): "La capacidad del suelo para interactuar con el ecosistema con el fin de mantener la productividad biológica, la calidad del medio ambiente y promover la salud de animales y plantas". Esta definición de calidad de suelo es similar a los tres criterios esenciales que fueron identificados por el Instituto Rodale (1991), denominados:

- *Productividad*: La capacidad del suelo para aumentar la productividad de la planta.

- *Calidad del medio ambiente*: La capacidad del suelo para atenuar la contaminación ambiental, los patógenos y daños externos.

- *Salud de los organismos vivos*: La interrelación entre la calidad del suelo y la salud humana, de los animales y las plantas.

Los parámetros para la evaluación de la calidad del suelo se pueden subdividir en físicos, químicos y biológicos. Los parámetros biológicos han adquirido una importancia particular en la evaluación de la calidad del suelo, ya que los organismos respondan con mayor rapidez que la mayoría de los parámetros químicos y físicos, a los cambios en el uso del suelo, las condiciones ambientales o la contaminación (Gil-Sotres 2005). Como se ha dicho, los organismos del suelo juegan un papel crucial en muchos procesos que sustentan la calidad del suelo, como la descomposición de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes, fijación de nitrógeno y la formación de agregados y la estabilización. Por esta razón, el tamaño de la biomasa microbiana del suelo, la respiración, la mineralización potencial de nitrógeno, las actividades enzimáticas, la abundancia de hongos, nematodos y lombrices han sido utilizados como indicadores de calidad de suelo (Doran 1987, Kennedy 1995, Wall 1999).

La biomasa microbiana se ha utilizado como un indicador de cambios inducidos por el manejo de los suelos (Ludwig 2010, Gosai 2010, Vestberg 2009). Algunos estudios han reportado diferencias en las respuestas de la biomasa microbiana a perturbaciones tales como la labranza. Kennedy y Smith (Kennedy 1995) encontraron en sus estudios que los campos con labranza mostraban mayor diversidad. El aumento de la diversidad en el ambiente con perturbación indica un cambio en la comunidad microbiana hacia una mayor gama de utilización de sustratos y resistencia al estrés (Collins 1999).

Las medidas de calidad de los suelos se han vuelto importantes en sistemas de comparación de opciones de manejo. Integrados a la evaluación de la calidad del suelo, están los estudios de la comunidad microbiana. A través de los microorganismos se pueden identificar cambios en la calidad global del suelo antes de que se produzcan modificaciones en ciertos parámetros físicos y químicos que con el tiempo impacten sobre la viabilidad de los cultivos y del suelo (Garbisu

2011, Cluzeau 2012). Los niveles de actividad, biomasa, y cambios en la comunidad pueden reflejar la estabilidad de un sistema con respecto al nivel de nutrientes, la cantidad de carbono utilizado, y la estructura general de la comunidad y función en un suelo.

Dado que la diversidad microbiana de los suelos agrícolas es fundamental para el mantenimiento de la formación del suelo, la eliminación de toxinas, y el ciclo de elementos, las medidas de diversidad se están volviendo cada vez más importante en la evaluación de la calidad del suelo. Ejemplos de rápidos cambios en la estructura de la comunidad podrían servir como indicadores tempranos de cambios en la calidad del suelo (Gómez-Sagasti 2012, Schimann 2012).

Sin embargo, la resiliencia del suelo puede ser diferente dependiendo de la perturbación. Procedimientos tales como la labranza pueden afectar a la situación biológica general, mientras que la aplicación de pesticidas sólo puede afectar a distintos grupos funcionales. Por lo que para establecer una relación entre la biodiversidad microbiana y la resiliencia del suelo, debe lograrse una mayor comprensión de los indicadores microbianos (Collins 1999).

Si bien la cantidad de grupos filogenéticos asociados a determinadas funciones en suelos es más una excepción que una regla y la amplia mayoría de bacterias encontradas no parecen cumplir funciones especificas, se ha documentado que son susceptibles a perturbaciones (Lauber 2009, Rousk 2010, George 2009). Fierer et al 2007 propone que las bacterias responden de forma diferente a la disponibilidad de sustratos sin estar asociadas a grupos filogenéticos acotados. Esta hipotesis sugiere que no es necesario vincular filogenia con función para ver diferencias ecológicas importantes en las comunidades frente a perturbaciones a las que el ambiente esta sometido. El hecho de poder estudiar las comunidades independientemente de su función en el suelo permite detectar variaciones en las poblaciones que pueden estar relacionadas con cambios en determinadas variables del ambiente. En el caso de los agroecosistemas, estos cambios en las comunidades pueden ser usados como indicadores biológicos de diferentes manejos agrícolas, aun sin saber con precisión cuál es o si existe una relación directa con una función fisiológica determinada en el suelo.

La agricultura en Argentina

La siembra directa en Argentina. Todavía a mediados de los años 70, el sistema de producción predominante en nuestro país era la labranza convencional. Los primeros experimentos a nivel locales en siembra directa fueron realizados por el italiano Marcelo Fagioli, en 1964, en Pergamino, en la provincia de Buenos Aires. Pero los ensayos que le siguieron no fueron siempre exitosos; algunas veces por la invasión de malezas y otras por la caída de los rendimientos, muchos productores perdieron confianza en el sistema y optaron por retornar a la práctica convencional. Los costos eran elevados, la maquinaria adecuada inexistente y los riesgos muy altos.

La difusión del sistema debió esperar el paso de otros 15 años, cuando la confluencia de la generalización de los problemas de erosión de suelos en el país, el aumento de los costos operativos y la aparición de herbicidas a menores precios que permitieran un control de malezas más efectivo, hicieran de la siembra directa una tecnología económicamente viable.

En Argentina, la rápida expansión del área bajo siembra directa de 9 millones de hectáreas en 1999 hasta 25 millones de hectáreas en 2009 sigue mostrando el creciente interés por esta tecnología en la agricultura (Aapresid-www.aapresid.org.ar) (Fig. 1.4).

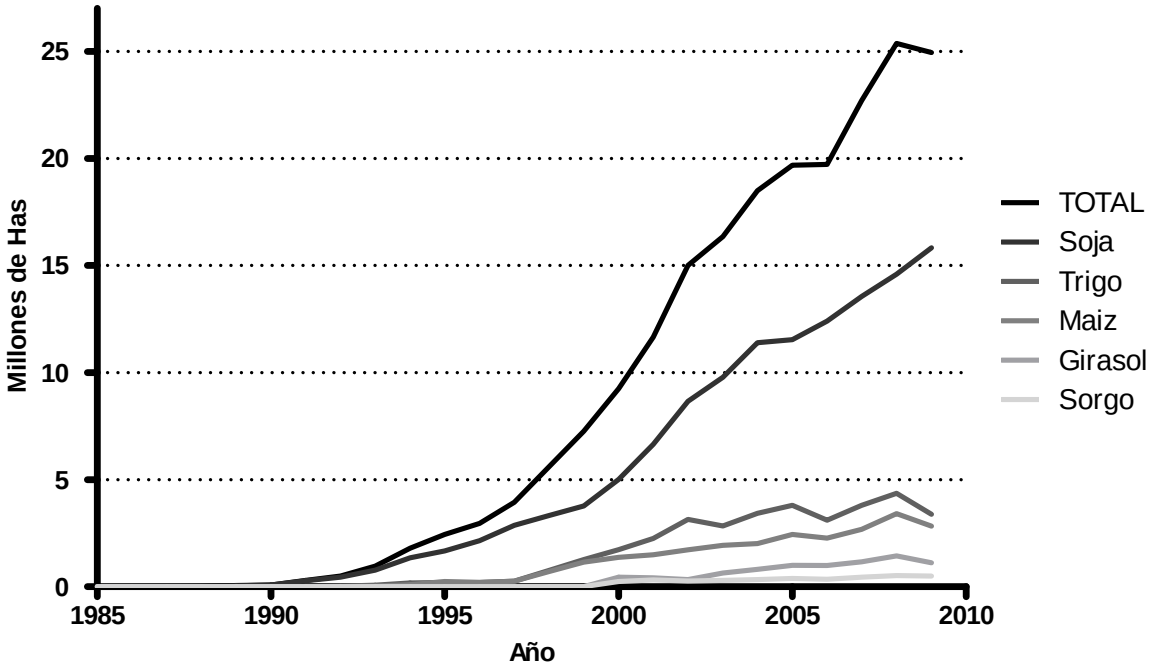

Fig. 1.4: Evolución de los cultivos bajo siembra directa entre los años 1985 y 2009.

Buenas prácticas agrícolas

En las primeras etapas de la siembra directa –fines de los 70 y principios de los 80– las principales ventajas que se vislumbraban estaban relacionadas a la protección del suelo de los efectos erosivos, tanto del viento como del agua. La presencia de rastrojos se convertía en un freno a la erosión y permitía tener más agua disponible para los cultivos.
Menor evaporación, sumado a menores pérdidas por escorrentía, y mayor infiltración daban como resultado una mayor disponibilidad del recurso limitante, el agua. De a poco, la rotación se fue ajustando a esta nueva oferta ambiental, los pisos de rinde subieron, y la productividad total creció; impacto que fue más notorio en zonas con ciertas limitaciones (suelos más sueltos de clima sub-húmedo y semiárido).
En períodos posteriores, el eje agronómico, pasa de la economía del agua a la del carbono y la materia orgánica, poniendo énfasis en su preservación e incremento. Todo ello, sin descuidar la nutrición, ya no sólo con la fertilización estratégica sino también con la incorporación de cultivos de cobertura de leguminosas, como "socios sin costo", para incorporar mediante la fijación biológica nitrógeno en los suelos.

En el año 2003 se definió el concepto de Buenas Practicas Agrícolas (BPAs) en el comité de agricultura de la FAO como prácticas que se ocupan de la sostenibilidad ambiental, económica y social de los procesos agropecuarios, y resultan en alimentos y productos agrícolas seguros y de calidad (FAO-COAG 2003). El concepto de BPAs puede servir como una herramienta de referencia para decidir, en cada paso del proceso de producción, en las prácticas y/o en los resultados, qué es ambientalmente sostenible y socialmente aceptable. La implementación de las BPAs por lo tanto, puede contribuir a la agricultura sustentable y al desarrollo rural. A partir de su creación, La Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (Aapresid) –Una organización no gubernamental sin fines de lucro, integrada por una red de productores agropecuarios– sugiere que es en este punto donde se plantea el nuevo desafío: registrar todo este conjunto de BPAs, midiendo en simultáneo indicadores de suelo que permitan dimensionar el impacto de las decisiones de manejo. Para esto, Aapresid propone certificar el proceso productivo en siembra directa a través de la Agricultura Certificada.

Agricultura Certificada

La Agricultura Certificada (AC) es un sistema de gestión de calidad de los procesos productivos en un sistema de Siembra Directa. Ha sido diseñado para mejorar la gestión empresarial y optimizar la eficiencia en el uso de los recursos, teniendo como resultado mayor productividad, en el marco de un sistema ambiental y energéticamente sustentable.
En sí misma, la AC consta de dos elementos constitutivos básicos: un manual de Buenas Prácticas Agrícolas (BPAs); y un protocolo de uso, medición y registro de indicadores de gestión ambiental, con foco en el recurso suelo. Aapresid se presenta como el organismo encargado de mantener vigente y actualizado el protocolo de certificación y la medición de indicadores, tomando de la ciencia y la experiencia los avances que ocurran en este sentido (Aapresid-www.aapresid.org.ar).

De los dos elementos que establecen el concepto básico de AC, el primero, las BPAs, constituye una serie de prácticas y manejos del suelo que apuntan hacia una producción sustentable y de alto rendimiento productivo, a la vez que garantizan un mantenimiento adecuado y a largo plazo de la calidad del suelo. Aapresid definió a las BPAs con seis puntos a tener en consideración:

1. Siembra Directa
2. Rotación de Cultivos
3. Manejo Integrado de Malezas, enfermedades, insectos y otras plagas
4. Manejo eficiente y responsable de agroquímicos
5. Nutrición estratégica
6. Gestión de la Información Ganadera

El segundo punto de importancia en el concepto de AC es la aplicación de distintas herramientas y conocimientos para una eficiente evaluación y gestión del recurso suelo. Al igual que en el resto del mundo, y como se mencionó anteriormente, uno de los problemas principales a la hora de generar estrategias de manejo del suelo es determinar su calidad y resiliencia. Para esto la utilización de factores indicadores de calidad del suelo que correlacionen con las BPAs se vuelve un punto fundamental.
Actualmente Aapresid dispone de distintos indicadores físicos y químicos, pero el tercer factor de importancia, el biológico, aun no está definido. Esto se debe, principalmente a que existe poca

información o muchas veces contradictoria de cuales podrían ser estos indicadores y cual es su capacidad de identificar los distintos manejos y predecir alteraciones que afecten la productividad del suelo (Alvarez 2006).

El consorcio BIOSPAS

Frente a la problemática planteada y a la necesidad de desarrollar herramientas de aplicación a escala regional a través del estudio particular de los suelos de la principal zona productora de granos en la Argentina, se crea en el 2007 el proyecto Biología del Suelos y Producción Agraria Sustentable (BIOSPAS). El consorcio está formado por 12 grupos de investigación de diferentes universidades o institutos del país, la asociación Aapresid y dos compañías privadas. El objetivo principal del BIOSPAS es utilizar un enfoque sistémico para entender cómo funciona el suelo en el sistema de siembra directa. Esto significa obtener una descripción polifásica de la diversidad biológica del suelo, comparando tres situaciones de manejo en diferentes ambientes. Este abordaje incluye datos generados mediante genómica, metagenómica y otras metodologías.

El desafío de este proyecto es desarrollar conocimiento y herramientas que nos permitan comprender mejor el sistema del suelo y encontrar la manera de enfocar ese conocimiento hacia una gestión más sensible y eficaz en las prácticas agrícolas. Para lograr este objetivo, con los recursos y conocimientos actuales, se utilizan enfoques muy distintos para cubrir todos los aspectos biológicos posibles y las funciones bioquímicas del suelo, a través de diferentes análisis realizados por todos los grupos participantes, sobre los mismos sitios y muestras de suelo (Wall 2011).

Objetivos específicos

Para la realización de este trabajo los objetivos propuestos fueron:

1. **Estudiar la composición de las comunidades bacterianas en suelos naturales y bajo distintos sistemas de siembra directa, haciendo uso de diferentes herramientas moleculares.**

2. **Analizar los efectos de la distribución geográfica, los distintos manejos agrícolas y las diferencias temporales en las comunidades.**

3. **Identificar y proponer el uso de indicadores biológicos capaces de diferenciar entre distintos sistemas de manejo agrícola.**

Descripción de los Sitios y Muestreo

El muestreo de los distintos suelos se llevó a cabo en consenso con los productores y los demás grupos que componen el BIOSPAS. Se seleccionaron 4 localidades representativas a lo largo de una línea este-oeste en la zona agrícola más productiva de la Argentina (Fig. 3.1). Las localidades seleccionadas fueron: Bengolea (Córdoba. 33º 01' 31" S; 63º 37' 53" O), Monte Buey (Córdoba. 32º 58' 14" S; 62º 27' 06" O), Pergamino (Buenos Aires. 33º 56' 36" S; 60º 33' 57" O) y Viale (Entre Ríos. 31º 52' 59,6" S; 59º 40' 07" O).

A lo largo de dos años se tomaron muestras en invierno y verano. Los muestreos correspondieron a Agosto 2009, Febrero 2010, Septiembre 2010 y Febrero 2011.

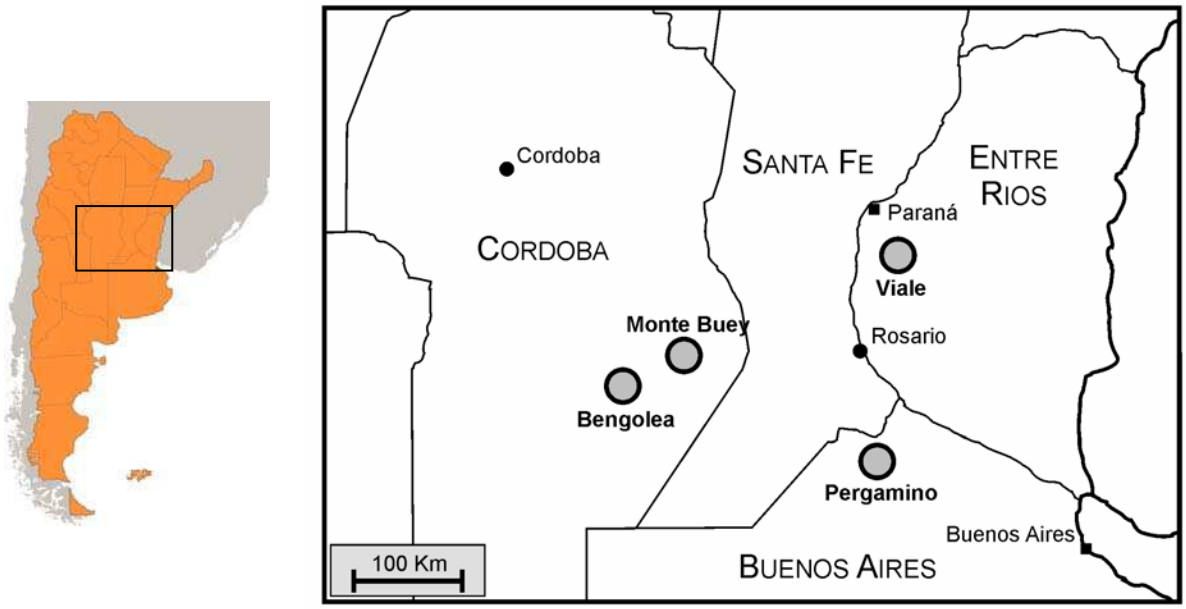

Fig. 3.1: Mapa con la ubicación de los cuatro sitios de muestreo. Bengolea (Córdoba), Monte Buey (Córdoba), Pergamino (Buenos Aires) y Viale (Entre Ríos).

En cada una de las localidades se tomaron muestras de 2 manejos agrícolas contrastantes y un control de campos no cultivados, cada uno por triplicado (submuestras) (Fig. 3.2). Los distintos manejos (tratamientos) se definieron según las características de las prácticas agrícolas que se llevan a cabo en ellos:

1- Ambiente Natural (**NA**): Ambiente natural con mínima actividad antrópica, ej: reserva natural, sectores "santuarios" que se conservan en algunos establecimientos, montes, sectores de parques. Estas áreas no han sido cultivadas ni trabajadas al menos por 40 años.
2- Malas Prácticas Agrícolas en Siembra Directa (**MP**): Campos manejados en siembra directa, con monocultivo o mínima rotación de cultivos y escasa reposición de nutrientes. Estos suelos se caracterizan por pasar gran parte del año sin ningún tipo de cobertura vegetal.
3- Buenas Prácticas Agrícolas (**BP**): Manejo permanente en sistema de siembra directa contemplando rotación intensiva, fertilización de reposición, manejo integral de plagas, malezas y enfermedades, con cultivos de cobertura en las etapas del año donde no se produce.

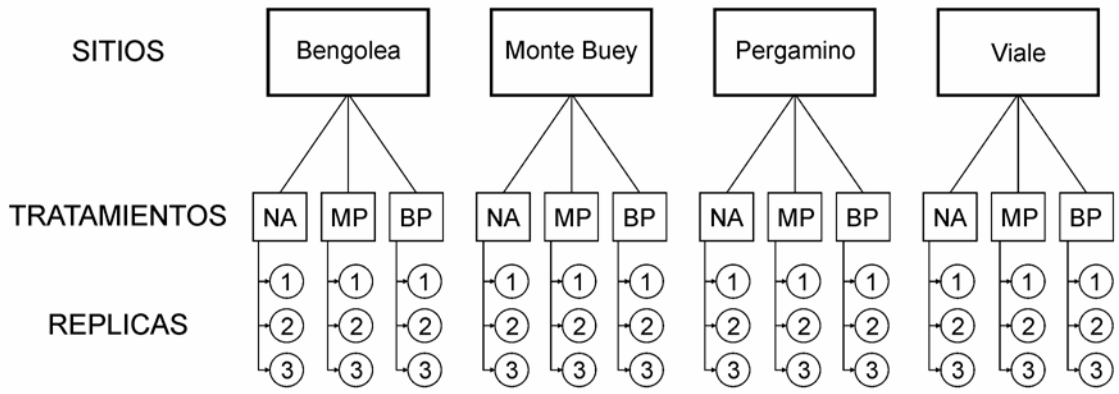

Fig. 3.2: Diseño experimental. Consiste en tres tratamientos (NA, MP y BP) para los cuales se tomaron tres submuestras (1, 2 y 3). Cada grupo de tratamientos se encuentra repetido en cuatro localidades distintas (sitios). NA: Área Natural, MP: Malas Prácticas Agrícolas y BP: Buenas Prácticas Agrícolas.

Dentro de cada tratamiento definido (Fig. 3.3) se muestrearon tres zonas separadas al menos por una distancia de 100 m. La metodología empleada para el muestreo consistió en tomar entre 16 y 20 núcleos de suelo de la capa superficial (fracción 0-10 cm de profundidad) separados al menos por dos metros unos de otros, dispuestos en forma de cuadrícula. Los núcleos se combinaron y homogeneizaron en el campo para obtener una única muestra compuesta. Durante el período de

muestreo y traslado, las muestras fueron almacenadas en frío y posteriormente congeladas a -20º C en el laboratorio hasta el momento de su análisis.

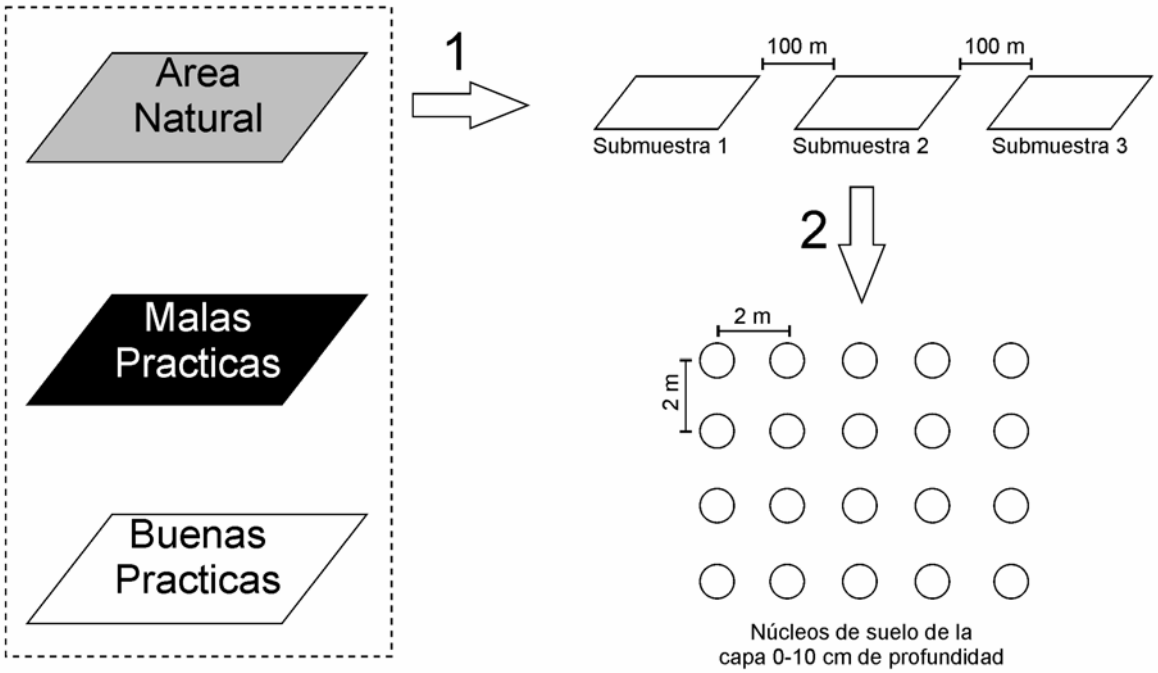

Fig. 3.3: Metodología empleada para el muestreo de suelos. En los cuatro sitios se tomaron muestras de los tres manejos previamente definidos. En la figura se muestra el procedimiento realizado en cada localidad. Para cada tratamiento se muestrearon tres sectores separados al menos por 100m (Flecha 1). Cada uno de estos sectores esta representado por una submuestra formada por la combinación de entre 16 a 20 núcleos de suelo (Flecha 2).

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN total del suelo se utilizó un método de extracción directa. Esta metodología tiene la ventaja de que el material genético obtenido no depende de un paso previo para separar los microorganismos de la matriz del suelo (Feinstein 2009, Frostegard 1999). Por otro lado, la utilización de *kits* comerciales específicamente diseñados para esta tarea aporta mayor reproducibilidad y estandarización. Básicamente, la mayoría de estos *kits* se basan en dos etapas: Primero, una ruptura mecánica-química de las células en el suelo, y después la purificación y elusión del ADN con columnas de afinidad.

Aproximadamente 50g de cada muestra fueron tamizados con una malla de 2mm para disgregar completamente el suelo y eliminar raíces y restos de plantas. Todo el procedimiento se realizó manteniendo una temperatura no superior a 4°C. Para las extracciones de ADN se tomaron 0,5g de cada una de las tres réplicas para cada muestra.

Para realizar las extracciones se partió de las muestras congeladas a -20°C, previamente tamizadas y homogeneizadas. Para las extracciones de ADN de las muestras se compararon distintos *kits* diseñados específicamente para tal fin: 1) *FastDNA Spin Kit for Soil* (MP-Bio), 2) *UltraClean Soil DNA Isolation* (MO-BIO), 3) *PowerSoil DNA Isolation* (MO-BIO). Con los tres *kits* probados se obtuvo ADN de suficiente tamaño y pureza para poder ser amplificado mediante PCR, mientras que en cuanto al rendimiento obtenido, el *kit* de MP-Bio fue mayor (Fig. 3.4). Teniendo en cuenta estos dos aspectos decidimos utilizar el kit FastDNA Spin Kit for Soil (MP-Bio). Debido a que muchas veces las extracciones de ácidos nucleicos del suelo co-extraen compuestos que pueden ser inhibitorios en las reacciones enzimáticas (ej. ácidos húmicos) (Zhou 1996, Kakirde 2010), se realizó un paso adicional de purificación durante la extracción, utilizando polivinilpirrolidona PVPP. Este compuesto tiene la capacidad de retener compuestos húmicos y disminuir la cantidad de contaminantes en la elusión final del ADN. El ADN se eluyó con buffer Tris 10 mM y se congeló a -20°C para su posterior utilización.

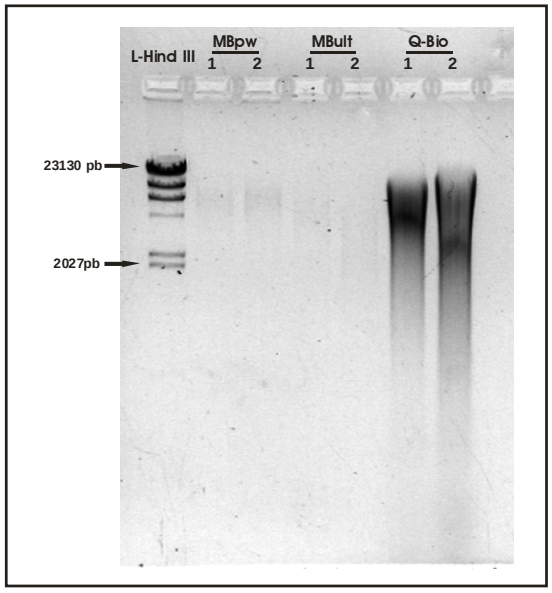

Fig. 3.4: Comparación de las extracciones de ADN con los distintos kits probados. MBpw: Mo-Bio powerSoil DNA Kit. MBult: Mo-Bio UltraClean Soil DNA Kit. Q-Bio: Q-Biogene FastDNA SPIN for Soil Kit. 1 y 2: Réplicas de la misma muestra de suelo. L-Hind III: Marcador de peso molecular. Gel de agarosa 1%. 5µl por calle.

Pirosecuenciación

Para el experimento de pirosecuenciación se utilizaron las muestras correspondientes a los tres tratamientos en cada uno de los sitios tomadas durante el muestreo de Agosto 2009. El paso inicial del experimento consistió en realizar una amplificación mediante PCR del gen del ARNr 16S en cada una de las muestras, utilizando los oligonucleótidos universales para el dominio bacteria 27F y 518R (Tabla 3.1) que generan un fragmento de aproximadamente 500 pb. Cada reacción de PCR de 50 µl contenía 0,3 µM de cada oligonucleótido, 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de $MgSO_4$, 1 unidad de Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen), 25 µl de buffer de reacción 2X y 15 ng de ADN de la muestra de suelo.

Debido a que cada una de las muestras incluye tres submuestras, primero se amplificaron cada una de ellas y las tres repeticiones se combinaron y purificaron de geles de agarosa utilizando el kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE) para finalmente tener una sola mezcla de los productos de PCR por cada muestra.

Una de las características de la pirosecuenciación es que permite analizar distintas muestras en un solo ensayo. Para esto el ADN amplificado de cada muestra debe estar marcado con una secuencia artificial única que después de la secuenciación permita asociarlo con la muestra correspondiente. Para realizar esta marcación los oligonucleótidos utilizados durante la PCR fueron diseñados con una secuencia de 10pb en su extremo 5' que es diferente para cada muestra (Tabla 3.1).

La pirosecuenciación fue realizada por el servicio de Genome Project Division Macrogen Inc. (República de Corea) con el sistema GS FLX Titanium (ROCHE).

Análisis bioinformático de las secuencias

Los archivos conteniendo las secuencias obtenidas en la pirosecuenciación fueron descargados de la base de datos de la empresa encargada del servicio.

Previo a comenzar con los análisis el archivo conteniendo todas las secuencias fue procesado para separar las secuencias en las 12 muestras correspondientes (12 archivos del tipo FASTA), detectar y eliminar los oligonucleótidos de la PCR en cada secuencia, y todas aquellas que tuviesen menos de 300 pb de largo y/o homopolímeros iguales o mayores a 8 pb. Para esto, y

para todos los análisis posteriores de las secuencias, se utilizó el programa Mothur (Schloss 2009).

El análisis de los archivos conteniendo las secuencias ya limpias y de al menos 300 pb comenzó con un alineamiento utilizando como referencia la base de datos SILVA para bacterias (Pruesse 2007). Se utilizó el método de alineamiento Needleman-Wunsch (Wilbur 1983). Una vez que se tuvieron las secuencias alineadas, se eliminaron los extremos para que todas comiencen y terminen en la misma posición. Aquellas secuencias que poseían entre 1 y 3 pb de diferencia con otras fueron consideradas iguales (diferencias menores al 1% para secuencias de 300 pb).

	Oligonucleótido 27F (5'- 3')	Oligonucleotido 518R (5'- 3')
1	**ACACGACT-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**ACACGACT-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
2	**ACAGTCAC-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**ACAGTCAC-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
3	**AGACGTCT-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**AGACGTCT-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
4	**AGTCACTG-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**AGTCACTG-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
5	**ATCGTACG-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**ATCGTACG-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
6	**CACATGTG-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**CACATGTG-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
7	**CAGTAGTC-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**CAGTAGTC-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
8	**CATGCTAG-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**CATGCTAG-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
9	**CGATATCG-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**CGATATCG-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
10	**CGTACGAT-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**CGTACGAT-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
11	**GACACTGT-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**GACACTGT-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG
12	**GAGTACAG-AC**-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	**GAGTACAG-AC**-WTTACCGCGGCTGCTGG

Tabla 3.1: Oligonucleótidos utilizados para la pirosecuenciación. Cada uno de los pares de cebadores utilizados en las 12 muestras distintas posee la misma secuencia de identificación (resaltada en negrita) delante de la secuencia de cada oligonucleótido.

Posteriormente se detectaron posibles quimeras mediante el programa acoplado a Mothur denominado Chimera Uchime. Todas las quimeras detectadas fueron eliminadas. Esto eliminó alrededor del 15% de las secuencias totales. Con las secuencias alineadas y libres de posibles quimeras, se calcularon las distancias genéticas para generar unidades taxonómicas operacionales (OTUs) utilizando valores de clasificación que consideran desde secuencias únicas hasta valores de similitud del 97% (considerado el valor clasificatorio a nivel de especie). Las distancias fueron calculadas con el método de furthest neighbor (en este caso para las secuencias agrupadas al 97%: Todas las secuencias dentro de un OTU son como máximo 3% distintas de las otras secuencias dentro de ese mismo OTU) (Schloss 2005).

A partir de las secuencias clasificadas en OTUs se construyeron curvas de rarefacción utilizando el método de re-muestreo sin reemplazo. También fueron calculados los índices de diversidad de Shannon mediante curvas colectoras que permiten saber cómo cambia el valor del índice a medida que aumenta el número de individuos en la muestra.
Para los análisis de comparación entre muestras se utilizó un cluster de disimilaridad (1-similaridad) generado con el algoritmo UPGMA utilizando la distancia de Bray-Curtis entre muestras. Este análisis se hizo para valores de agrupamientos en OTUs al 97% de similitud.

Luego del procesamiento y los análisis de las secuencias con el programa Mothur se clasificaron taxonómicamente utilizando la herramienta Classifier de Ribosomal Database Project (RDP) (Cole 2009). Esto permitió asignar a cada secuencia una clasificación taxonómica, con un valor mínimo de confiabilidad calculado por bootstrap del 80% (Wang 2007) para cada nivel taxonómico.

Con esta clasificación se separaron las secuencias en grupos taxonómicos y se generaron nuevos archivos para cada sitio y tratamiento conteniendo solo las secuencias especificas de cada taxón (12 archivos por cada grupo). Los grupos seleccionados fueron Actinobacteria, Acidobacteria, Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Firmicutes. Los nuevos archivos de secuencias generados fueron analizados de la misma forma que se describió anteriormente para todo el conjunto de secuencias.

Construcción de los Árboles filogenéticos

Para la construcción de los árboles se utilizaron secuencias obtenidas de la pirosecuenciación y secuencias depositadas en la base de datos de RDP (Cole 2009). Antes de construir los árboles, las secuencias se alinearon utilizando el programa Clustal W (Thomson 1994). Después del alineamiento las secuencias con menos de 450 pb fueron eliminadas y los extremos de las restantes se recortaron para que todas abarquen la misma región. Para la construcción de los árboles se utilizó el programa MEGA versión 4 (Tamura 2007) con el método de Neighbor-Joining (Saitou 1987) con un test de bootstrap con 1.000 repeticiones.

Cuantificación de bacterias por PCR en tiempo real (qPCR)

Para la implementación de esta técnica el primer paso fue la puesta a punto de las condiciones de PCR para cada par de oligonucleótidos utilizado. La efectividad de los cebadores se determinó utilizando ADN extraído del suelo para amplificar el gen 16S del ARN ribosomal (ARNr) según las condiciones sugeridas por la bibliografía de donde se obtuvieron dichos oligonucleótidos (Tabla 3.2).

Grupo	Nombre	Secuencia 5'-3'[(1)]	Referencia
Bacteria Total	Eub338	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Fierer 2005
Bacteria Total	Eub518	ATTACCGCGGCTGCTGG	Fierer 2005
Bacteria Total	E786Fdb	GATTAGADACCCBGGTAG	Modif. de Coloqhoun 1997 en Baker 2003
Bacteria Total	E1115R	AGGGTTGCGCTCGTTG	Reysenbach and Pace 1995
Alpha Proteobacteria[(2)]	Alf685	TCTACGRATTTCACCYCTAC	Fierer 2005
Beta Proteobacteria	Bet680	TCACTGCTACACGYG	Fierer 2005
Actinobacteria	Actino235	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	Fierer 2005
Firmicutes	Lgc353	GCAGTAGGGAATCTTCCG	Fierer 2005
Planctomycetes	Pln930R	CTCCACCGCTTGTGTGA	Blackwood 2005
Bacteroidetes	Cfb319	GTACTGAGACACGGACCA	Fierer 2005
Acidobacteria	Acid31	GATCCTGGCTCAGAATC	Fierer 2005
Gemmatimonadetes	Gem440	TTCGGRKTGTAAACCACTGT	Phillipot 2009
Verrucomicrobia	Verr349	GYGGCASCAGKCGMGAAW	Phillipot 2009
Chloroflexi	GNSB941R	AAACCACACGCTCCGCT	Gich 2001
Xanthomonadaceae	Xan878F	CTAACGCGTTAAGTTCGC	Este trabajo
Acidobacteria Gp1	Gp1Ac 650R	TTTCGCCACAGGTGTTCC	Este trabajo
Subgrupo Acidobacteria Gp1	SubGp1-143F	CGCATAACATCGCGAGGG	Este trabajo
Rubellimicrobium	Rub290F	GAGAGGATGATCAGCAAC	Este trabajo
Rubellimicrobium	Rub547R	CGCGCTTTACGCCCAGTC	Este trabajo

Tabla 3.2: Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR. Oligonucleótidos universales para bacteria y específicos para los distintos grupos. [(1)]R: G o A, Y: T o C, K: G o T, S: G o C, M: A o C, W: A o T, B: G, T o C y D: G, A o T. [(2)] También amplifica algunos Delta y Fusobacteria.

En aquellos casos donde se probaron nuevas combinaciones de cebadores, muestras del mismo ADN se amplificaron mediante PCR con gradiente de temperatura, con el fin de determinar la temperatura óptima de apareamiento a la cual amplificar. Los cebadores y las combinaciones probadas que no produjeron una única banda del tamaño esperado no fueron utilizados para ninguno de los análisis.

Para la cuantificación del número de copias del gen se utilizó la técnica de medición del incremento de fluorescencia del fluorosforo SYR Green II unido al ADN de doble cadena generado durante la amplificación (Dorak 2007). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un equipo para PCR en tiempo real DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, USA).

Cada reacción consistió de un volumen final de 20 µl conteniendo 10 µl de SYBR green Master Mix 2X (Applied Biosystems, UK), 0,5 µM de cada oligonucleotido, 0,25 µg/µl de BSA y 10 ng de ADN de la muestra.
La cuantificación absoluta del número de copias del gen se realizó comparando los valores de fluorescencia con una curva de estándares generada a partir de diluciones seriadas (1:10) de un número conocido de copias del mismo gen. Como estándar se utilizaron productos de PCR purificados o plásmidos con la secuencia del gen insertada.
Para generar las curvas de estándares utilizadas durante la cuantificación absoluta del número de copias del gen debieron construirse bibliotecas de clones para cada uno de los pares de cebadores utilizados. Los productos de PCR obtenidos de la amplificación con cada par de cebadores de las muestras de suelo fueron purificados y ligados a un vector de 3000 pb (pGEM-T Easy Vector. Promega) para transformar células de *Escherichia coli DH5α* con el fin de obtener bacterias aisladas portando plásmidos con el inserto correspondiente a cada grupo. A partir de clones de *E. coli* transformadas con el plásmido portando la secuencia especifica del gen de ARNr 16S se realizaron extracciones del ADN plasmídico (Ausubel 2004), se purificó, se linealizó con encimas de restricción y se cuantificó mediante absorbancia a 260 nm (NanoDrop. Thermo Scientific). El número de copias del estándar puro se calculó a partir del tamaño del vector portando el inserto y la concentración de ADN en la solución. A partir de este ADN se realizaron diluciones seriadas de 1:10 para construir las curvas de calibración de la qPCR. La cuantificación del número de copias del gen ARNr 16S para los taxones específicos se calculó como la relación entre las copias especificas con el total de copias obtenidas con los cebadores universales para

bacteria. Esta relación además tiene la ventaja de que al utilizarse la misma solución de ADN de la muestra para realizar ambas cuantificaciones, se elimina cualquier variación que pudiese existir producto de la dilución del ADN. Las cuantificaciones de cada muestra se realizaron por triplicado a partir de tres submuestras.

La mayoría de los oligonucleótidos diseñados previamente a este trabajo por otros grupos de investigación fueron utilizados según las combinaciones y condiciones sugeridas en la bibliografía (Tabla 3.3).

Grupo	Cebador F	Cebador R	Largo (pb)	Condiciones para la amplificación
Bacteria Total	Eub338	Eub518	200	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 53º C por 20 seg. y 72 º C por 30 seg.
Alpha Proteobacteria	Eub338	Alf685	350	1 ciclo de 94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 60 º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Beta Proteobacteria	Eub338	Bet680	360	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 60º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Actinobacteria	Actino235	Eub518	250	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 60º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Firmicutes	Lgc353	Eub518	180	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 60º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Planctomycetes	E786Fdb	Pln930R	150	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 56º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Bacteroidetes	Cfb319	Eub518	220	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 58º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Acidobacteria	Acid31	Eub518	500	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 50º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Gemmatimonadetes	Gem440	Eub518	100	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 60º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Verrucomicrobia	Verr349	Eub518	150	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 62º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Chloroflexi	E786Fdb	GNSB941 R	200	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 56º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Xanthomonadaceae	Xan878F	E1115R	400	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 61º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Subgrupo Acid Gp1	SubGp1-143F	Gp1Ac 650R	550	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 59º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.
Rubellimicrobium	Rub290F	Rub547R	280	94º C, 10 min. 35 ciclos de 94º C por 30 seg., 59º C por 20 seg. y 72º C por 30 seg.

Tabla 3.3: Combinaciones de cebadores y condiciones de la PCR utilizadas para cuantificar mediante qPCR el número de copias del gen ARNr 16S de bacterias totales y grupo taxonómicos específicos.

En el caso de los grupos Planctomycetes y Chloroflexi se modificó el cebador universal para bacteria E786F (GATTAGATACCCTGGTAG) introduciendo dos degeneraciones en su secuencia (Tabla 3.2) para aumentar el número de secuencias blanco. Esto permitió un incremento en el número de secuencias blanco de 81,5% a 86,9% para bacterias totales, de 9,5% a 79,4% para Chloroflexi y de 7,1% a 91,2% para Plactomycetes. Estos valores son de acuerdo a análisis *in silito* utilizando la herramienta ProbeMatch y todas las secuencias mayores a 1200 pb que se encuentran en la base de datos de RDP (Cole 2009).

Nuevos oligonucleótidos diseñados

Debido a que para muchos de los grupos que se necesitó cuantificar no existían cebadores disponibles en la bibliografía o bases de datos especializadas, fue necesario diseñar y sintetizar nuevos oligonucleotidos. Para el grupo correspondiente a la familia Xanthomonadaceae perteneciente a la clase Gammaproteobacteria, se diseñó un nuevo oligonucleótido a partir de las secuencias conocidas de este grupo disponibles en la base de datos de RDP. Utilizando el programa PRIMEROSE (Ashelford 2002) se identificaron para esta familia los posibles oligonucleótidos específicos que puedan ser usados en ensayos de PCR. Posteriormente se seleccionaron los oligonucleótidos que cumplieran con los requisitos necesarios para los experimentos (ej. largo y tamaño del producto de PCR generado en combinación con otros cebadores). Para los oligonucleótidos seleccionados se determinó la especificidad por las secuencias blanco utilizando la base de datos de RDP y la herramienta ProbeMatch. Se seleccionó el oligonucleótido capaz de unirse al mayor número de secuencias dentro del grupo (94,5%) y al menor número posible de secuencias distintas de la familia Xanthomonadaceae.
Se determinaron mediante PCR con gradiente de temperatura las mejores condiciones de amplificación para este oligonucleótido en combinación con otros dos cebadores universales para el dominio bacteria que permiten generar un fragmento de aproximadamente 250 pb para ser utilizado en ensayos de qPCR (Tabla 3.3) y uno de entre 600-700 pb para utilizar posteriormente en experimentos de DGGE (ver más adelante).

Para los oligonucleótidos que tienen como blanco las bacterias de la clase Acidobacteria Gp1, uno de los cebadores fue diseñado para amplificar todas las bacterias del Grupo 1 de Acidobacteria. El oligonucleótido seleccionado se denominó Gp1Ac650R y según las pruebas *in*

silico utilizando las bases de datos para el gen ARNr 16S (RDP) es capaz de unirse al 91,3% de las secuencias del grupo. Para lograr la especificidad de la PCR para el grupo indicador, se diseñó un segundo oligonucleótido (denominado SubGp1-143F) mucho más específico y restringido sólo a las 100 secuencias que forman el grupo indicador. Este cebador es capas de aparearse con el 99% del total de secuencias del grupo.

Para el grupo compuesto por el género *Rubellimicrobium,* tratándose de un grupo filogenéticamente bien definido se utilizaron las secuencias disponibles en las bases de datos (RDP) para diseñar oligonucleótidos capaces de amplificar las secuencias de estas bacterias selectivamente. Los dos cebadores diseñados (Rub290F y Rub547R) en combinación poseen una especificidad por el género del 99,2%. El procedimiento de diseño, prueba y puesta a punto de las condiciones para la PCR fue el mismo que el empleado para la familia Xanthomonadaceae. Para estos dos grupos se utilizaron combinaciones de ambos cebadores específicos como se detalla en la Tabla 3.3.

Análisis estadístico de los resultados de qPCR

El efecto de los sitios, tratamientos y estaciones del año sobre el número de copias del gen ARNr 16S de bacterias totales (expresados como copias x gramos de suelo^{-1}) y de grupos específicos (porcentaje de copias del grupo con respecto al total de bacterias) se analizó utilizando modelos lineales mixtos (Zuur et al. 2009). Los efectos fijos considerados en el modelo fueron sitio, tratamiento, estación y sus interacciones, mientras que en los efectos aleatorios se incluyeron jerárquicamente los factores año, lote y submuestra. Se verificaron los supuestos de homocedacia y normalidad de residuos, modelando la heteroscedasticidad y/o transformando logarítmicamente los datos en aquellos casos en que fue necesario. En todos los casos se compararon los modelos ajustados, seleccionando el más parsimonioso de acuerdo al valor indicador AIC del programa estadístico. Se realizaron comparaciones múltiples entre medias del tipo LSD Fisher con un valor de alfa=0,05 cuando se observaron diferencias significativas. En los casos donde se encontraron efectos de interacción entre las variables, las diferencias entre muestras se analizaron mediante contrastes entre pares de medias con valores de significancia de $p<0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2011 (Di Rienzo 2011).

DGGE

Para el análisis se utilizó la técnica de PCR-DGGE anidado. Esta técnica consiste en amplificar primero con los cebadores específicos para el grupo seleccionado el gen ARNr 16S, según las condiciones de la tabla 3.3, y después a partir del producto de PCR obtenido con oligonucleótidos universales para bacteria que poseen las modificaciones especificas para DGGE (341GC y Eub518) (Loisel, 2006). Las condiciones de la segunda PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 94° C, por 5 min.; 30 ciclos de 94° C por 30 seg., 55° C por 30 seg. y 72° C por 30 seg.; y una extensión final a 72° C por 5 min.

Los fragmentos de aproximadamente 200 pb generados en la segunda PCR se separaron en un gel de acrilamida 8% con un gradiente creciente desnaturalizante de urea/formamida entre 35% y 65% de agente desnaturalizante. La electroforesis del gel se hizo en buffer TAE en una cuba vertical (CBS Scientific Company) con control de temperatura por 18 horas a 65V y 60° C.

Para los DGGE de Xanthomonadaceae, debido a que por su ubicación no podían ser utilizados los cebadores 341GC y Eub518, se utilizó la combinación de oligonucleótidos Xan878 y 1509 que generan un fragmento de aproximadamente 700 pb a partir de la primer PCR. Para la segunda PCR anidada se utilizaron los cebadores 984GC-1378 universales para bacteria con las respectivas modificaciones para DGGE que generan un fragmento de aproximadamente 400 pb. Las condiciones de la primer PCR consistieron en: 94° C, por 5 min.; 25 ciclos de 94° C por 30 seg., 54° C por 30 seg. y 72° C por 60 seg.; y una extensión final a 72° C por 5 min. Mientras que para la segunda PCR fueron: 94° C, por 5 min.; 30 ciclos de 94° C por 30 seg., 56° C por 20 seg. y 72° C por 45 seg.; y una extensión final a 72° C de 5 min. Para las condiciones de la electroforesis se utilizó un gel de acrilamida 8% con un gradiente desnaturalizante entre 45 y 65% por un periodo de 18 horas a 100V y 60° C.

Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos en una solución de buffer TAE y SYBR Gold (Invitrogen) durante 45 min. en agitación suave y luego lavados con agua destilada por 15min.

Para su documentación, fotos de los geles fueron tomadas en un transiluminador (G:BOX, Syngene) con luz UV y almacenadas en formato *.tif* para su posterior análisis.

Análisis de los resultados de DGGE

Para el procesamiento de las imágenes de los geles realizados, se utilizó el programa GELCOMPAR (Applied Maths, Belgium). Las imágenes se cargaron al programa y se determinó la posición e intensidad de las bandas. La información del patrón de bandas característico de cada muestra se extrajo en formato de matriz de datos, donde figura la intensidad y posición para todas las bandas con respecto al largo del gel.

A partir del patrón de bandas generado en el DGGE se compararon las muestras teniendo en cuenta la posición e intensidad de cada banda. La posición de cada una de las bandas en el gel está determinada por su secuencia de ADN y la cantidad de GC (en este caso corresponde al gen del ARNr 16S). Sin embargo, a pesar de la capacidad del DGGE para separar moléculas de ADN según su composición nucleotídica, esto no significa necesariamente que varias secuencias puedan ocupar la misma posición, o que cada banda corresponda a una única bacteria (Schmalenberger 2003). Por esto, los análisis de diversidad realizados sobre DGGE no reflejan la diversidad propia de la comunidad, sino que son un patrón representativo de esa comunidad (Loisel 2006) y una herramienta útil para comparar comunidades.

La comparación entre los patrones obtenidos de las muestras se realizó utilizando el programa PAST Versión 2.12 (Hammer 2001). Se compararon las muestras en cada gel utilizando la matriz de datos, mediante análisis de similitud (ANOSIM) (Clarke, 1993). Los valores de similitud entre muestras se calcularon con las distancias de Bray-Curtis, que tiene en cuenta la presencia/ausencia de las bandas y su intensidad relativa. ANOSIM es un test no paramétrico que determina diferencias significativas entre dos o más grupos, basado en las distancias calculadas entre todas las muestras. Para el análisis las distancias son convertidas a rangos. El test se basa en la comparación de las distancias entre grupos con las distancias dentro de los grupos.
Siendo r_b el rango medio de todas las distancias entre grupos, y r_w el rango medio de todas las distancias dentro de los grupos, el estadístico R se define como:

$$R = \frac{r_b - r_w}{N(N-1)/4}.$$

Donde valores positivos altos de R (hasta 1) significan baja similaridad entre grupos. La significancia a una cola es calculada mediante 9.999 permutaciones de los valores en los grupos. Se consideraron diferencias significativas a los valores de $p< 0,05$.

Detección de indicadores

Especies indicadoras son especies que, debido a las preferencias de sus nichos, pueden ser utilizadas como indicadores ecológicos de tipos de comunidades, condiciones del hábitat o cambios ambientales. Por lo general se determinan mediante un análisis de la relación entre los valores observados de presencia-ausencia o de abundancia de especies en un grupo de muestras y una clasificación de las mismas muestras en función de los factores que las definen (De Cáceres 2010, Keith 2012, Hartmann 2009, Koeppel 2012).

Para determinar la existencia de posibles grupos indicadores de tratamientos se llevó a cabo un análisis estadístico de significancia entre taxones, considerando su abundancia y los manejos de suelo correspondientes a malas prácticas agrícolas, MP y buenas prácticas agrícolas, BP.

Se utilizó el índice del valor de indicador (IndVal) de especies. Este índice se calcula como el producto entre dos cantidades (A) y (B), donde (A) se define como la abundancia media de OTUs en el grupo, dividido la suma de la abundancia media de todos los grupos. La cantidad (B) está definida como la frecuencia relativa de OTUs dentro del grupo (Dufrene 1997, De Cáceres 2009).

Considerando que la mayoría de OTUs a nivel de especies (disimilaridad del 3%) poseen pocas secuencias, se decidió utilizar un valor de clasificación mayor, considerado generalmente a nivel de familia (5% disimilaridad).

El índice IndVal puede tomar valores entre 0 y 1, donde 1 representa el mejor valor posible. El valor para cada OTU puede ser probado mediante una prueba de hipótesis para la cual se obtiene un valor de significancia. Se tomaron los valores de índice con una significancia máxima de $p=0,05$.

El análisis se realizó utilizando la función *IndVal* del paquete estadístico “labdsv” del programa R (R Development Core Team 2012).

Debido a que para un gran número de OTUs la probabilidad de obtener falsos positivos con un valor de $\alpha=0,05$ es muy alta, es necesario realizar una corrección para pruebas múltiples con el

fin de disminuir el error de tipo I (De Cáceres 2010). Se realizó un análisis de significancia (False-Discovery Rate) (Verhoeven 2005) sobre los valores p del índice IndVal y se tomaron los valores significativos con un $q<0,05$. Para este análisis se utilizó la función *qvalue.gui* del paquete "qvalue" de R.

Descripción de los suelos y manejos

Uno de los objetivos principales de este trabajo y del proyecto en el que se enmarca, es determinar de que manera los distintos manejos agrícolas de suelos de la región central productora de granos de nuestro país afectan las características biológicas de los distintos suelos, independientemente de sus condiciones formadoras o las zonas geográficas. Para esto los distintos tratamientos o manejos se han definido en cuanto a resultados de productividad, regimenes de rotación de cultivos, cultivos de cobertura y uso de agroquímicos (Tabla 4.1).

Otros factores que no tienen directa relación con el tipo de manejo, pero que afectan directamente a la biología del suelo y sus características químicas y disponibilidad de agua y nutrientes, son el tipo y la textura del suelo (Tabla 4.2).

	BENGOLEA		M. BUEY		PERGAMINO		VIALE	
	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP
Soja ($kg.ha^{-1}$)	3067	2775	3167	2675	2933	2825	3000	1805
Incremento BP/MP (%)	10,52%		18,4%		3,8%		66,2%	
Maíz ($kg.ha^{-1}$)	10500	2700	12550	8000	9500	- (4)	7030	3450
Incremento BP/MP (%)	289%		56,9%				103,8%	
Siembra directa (%)	100	80	100	100	100	100	100	100
Relación soja/Maíz	1,5	4	0,67	4	1,5	5	1,5	4
Trigo de cobertura(1) (%)	60	40	60	20	40	0	40	20
Otros cultivos de cobertura(2) (%)	20	0	40	0	0	0	20	0
Herbicidas(3) (Litros)	27,7	43,8	25,2	38,9	29,3	46,5	34,5	43,1

Tabla 4.1: Rendimiento de los cultivos y manejos agrícolas aplicados en los sitios de Buenas Prácticas (BP) y Malas Prácticas (MP). Los datos corresponden al promedio de los últimos 5 años hasta el inicio del proyecto (2005 – 2009). (1): Porcentaje de inviernos en los que el trigo fue utilizado como cultivo de cobertura. (2): Porcentaje de inviernos en los que se utilizó otro tipo de cultivo de cobertura (Vicia sp., Melilotus alba o Lolium perenne). (3): Cantidad de litros correspondientes a la suma de herbicidas de baja y moderada toxicidad. La toxicidad se definió según las categorías de toxicidad de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). (4): No se plantó maíz durante los 5 años.

	Bengolea			Monte Buey			Pergamino			Viale		
	AN	BP	MP	AN	BP	MP	AN	BP	MP	AN	BP	MP
Clasificación del suelo	Haplustol Entico			Argiudol Típico			Argiudol Típico			Pelludert Argico		
Textura	Franco arenoso			Franco limoso			Franco limoso			Arcillo limoso Franco arcillo limoso		

Tabla 4.2: Clasificación de los suelos para cada uno de los sitios y sus tratamientos. La clasificación del suelo corresponde a la del mapa del suelo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Se ha visto que suelos con texturas más finas, como los arcillosos, poseen la capacidad de retener mayor cantidad de agua y carbono orgánico. Esto puede verse para los suelos muestreados en la localidad de Viale donde las cantidades de C orgánico son mayores independientemente del tratamiento (Tabla 4.3).

En los suelos naturales (NA) el porcentaje de carbono orgánico es mayor que en los suelos bajo producción, en cada sitio en particular. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los dos tipos de manejo agrícola (Tabla 4.3).

	Bengolea			Monte Buey			Pergamino			Viale		
Agosto 2009	AN	BP	MP	AN	BP	MP	AN	BP	MP	AN	BP	MP
Carbono orgánico (%)[(1)]	1,7	1,5	1,1	3,5	2,1	1,7	2,7	1,7	1,8	5,0	3,5	2,5
Nt (%)[(2)]	0,146	0,156	0,125	0,328	0,181	0,132	0,233	0,153	0,136	0,369	0,283	0,179
P extractable (ppm)[(3)]	44,3	53,1	17,8	296,5	126,5	20,6	10,5	18,0	11,9	20,2	40,4	41,8
pH[(4)]	6,3	6,2	6,2	5,6	5,5	6,2	6,2	6,0	5,7	6,4	6,7	6,3
Febrero 2010												
Carbono orgánico (%)	1,7	1,4	1,2	3,1	1,8	1,6	3,2	1,7	1,7	3,5	3,4	2,5
Nt (%)	0,141	0,129	0,112	0,282	0,176	0,127	0,246	0,142	0,141	0,203	0,233	0,156
P extractable (ppm)	43,1	37,2	26,2	395,1	122,3	17,3	16,6	25,3	22,0	24,3	50,4	43,1
pH	6,7	6,5	6,6	6,4	6,5	6,6	6,6	6,4	6,6	7,0	6,9	6,7
Septiembre 2010												
Carbono orgánico (%)	1,8	1,6	1,3	3,6	2,2	1,8	2,9	1,9	1,9	3,3	3,9	2,6
Nt (%)	0,137	0,121	0,110	0,285	0,171	0,133	0,239	0,157	0,145	0,258	0,291	0,203
P extractable (ppm)	13,8	7,1	9,6	345,6	71,3	6,3	4,3	11,2	5,2	5,7	27,4	33,3
pH	6,0	5,8	5,7	5,5	5,6	6,1	5,7	5,6	6,1	6,4	6,8	5,7
Febrero 2011												
Carbono orgánico (%)	1,7	1,4	1,3	3,8	2,4	1,9	3	1,8	1,9	3,6	3,6	2,7
Nt (%)	0,127	0,120	0,101	0,325	0,193	0,135	0,252	0,155	0,142	0,273	0,299	0,202
P extractable (ppm)	20,9	24,9	8,9	356,1	164,9	8,2	4,8	13,3	2,0	10,2	20,5	36,3
pH	6,1	5,6	6,1	5,6	5,5	6,2	5,8	5,6	6,0	6,1	6,5	5,9

Tabla 4.3: Principales características químicas de los suelos en estudio para los distintos sitios y tratamientos en los cuatro muestreos realizados (Duval 2010, Duval 2012). (1): Carbono orgánico: método de combustión (1500ºC) analizador automático LECO C Analyser, perteneciente al LANAIS-^{15}N – CONICET. (2): Nitrógeno total (Nt): método de Kjeldahl, Bremner (1996). (3): Fósforo extractable (Pe): método de Bray y Kurtz (1945). (4): pH (relación suelo-agua 1:2,5).

Bacteria Total

El número total de bacterias en cada tiempo, sitio y tratamiento se cuantificó a partir del ADN total mediante qPCR del número total de copias del gen ARNr 16S. Se encontró que la cantidad promedio de copias del gen ARNr 16S de bacterias por gramo de suelo estaba aproximadamente entre $2{,}5x10^{10}$ y $3{,}75x10^{10}$ copias en los distintos muestreos. Teniendo en cuenta que el número medio de copias por genoma del gen que codifica para el ARN ribosomal se estima en 3,6 copias (Lee 2009), se calculó que la cantidad de bacterias rondaba entre $1{,}3x10^{9}$ y $2{,}5x10^{10}$ células por gramo de suelo. Los análisis estadísticos utilizando modelos mixtos mostraron diferencias significativas entre temporadas (p=0,0357) y entre tratamientos (p=0,0029). Las comparaciones realizadas entre las medias de los distintos tratamientos indicaron que existían diferencias que separaban a los ambientes naturales de los sistemas de cultivo, pero no a las MP de las BP (Fig. 4.1).

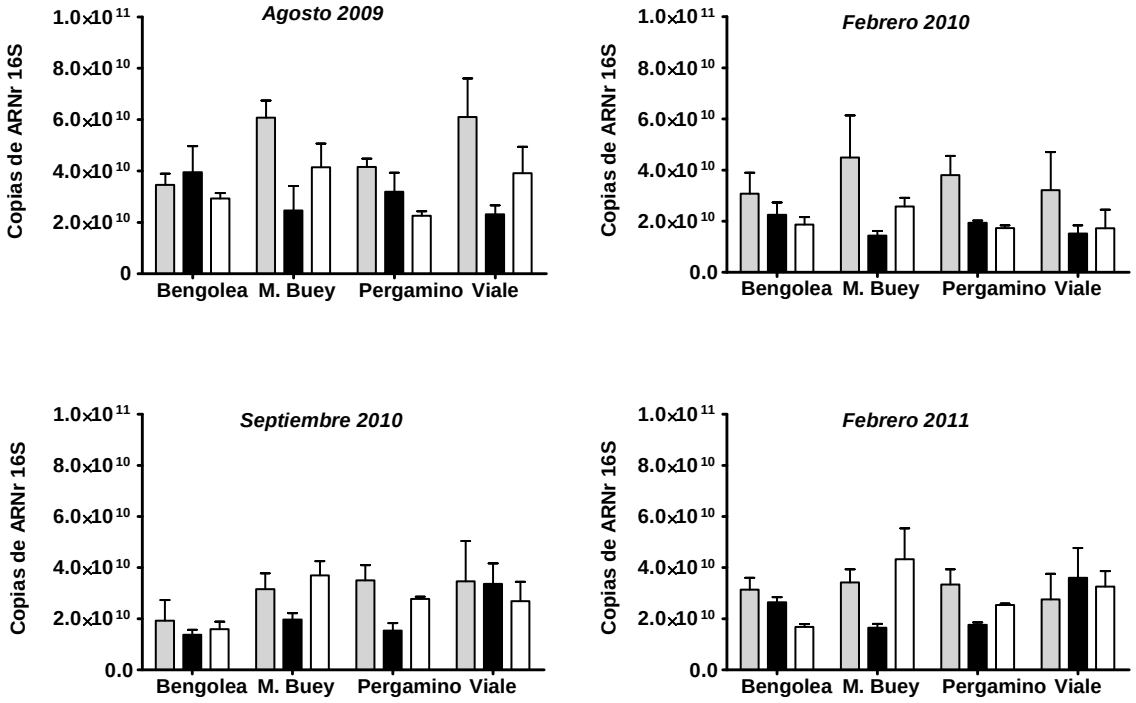

Fig. 4.1: Copias del gen ARNr 16S por gramo de suelo. Gris: Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

Composición general de las comunidades

La aparición de la pirosecuenciación y su perfeccionamiento en los últimos años han hecho que se convierta en una herramienta extraordinaria en los estudios de ecología microbiana. Esta técnica permite, a partir de una simple PCR de la muestra ambiental, obtener alrededor de 300.000 secuencias del gen de interés. En el caso del gen de ARNr 16S, ampliamente utilizado para estudiar la composición de las comunidades bacterianas, este número nos permite conocer con amplio grado de cobertura la composición de una muestra compleja. En este caso se obtuvieron entre 16.000 y 27.000 secuencias de buena calidad de cada una de las muestra, con excepción de la muestra natural de Monte Buey donde por problemas en la secuenciación el número fue de alrededor de 3.000 secuencias. Por esta razón, considerando que esta muestra no era representativa y comparable al resto, no fue utilizada para la mayoría de los análisis (Fig. 4.2).

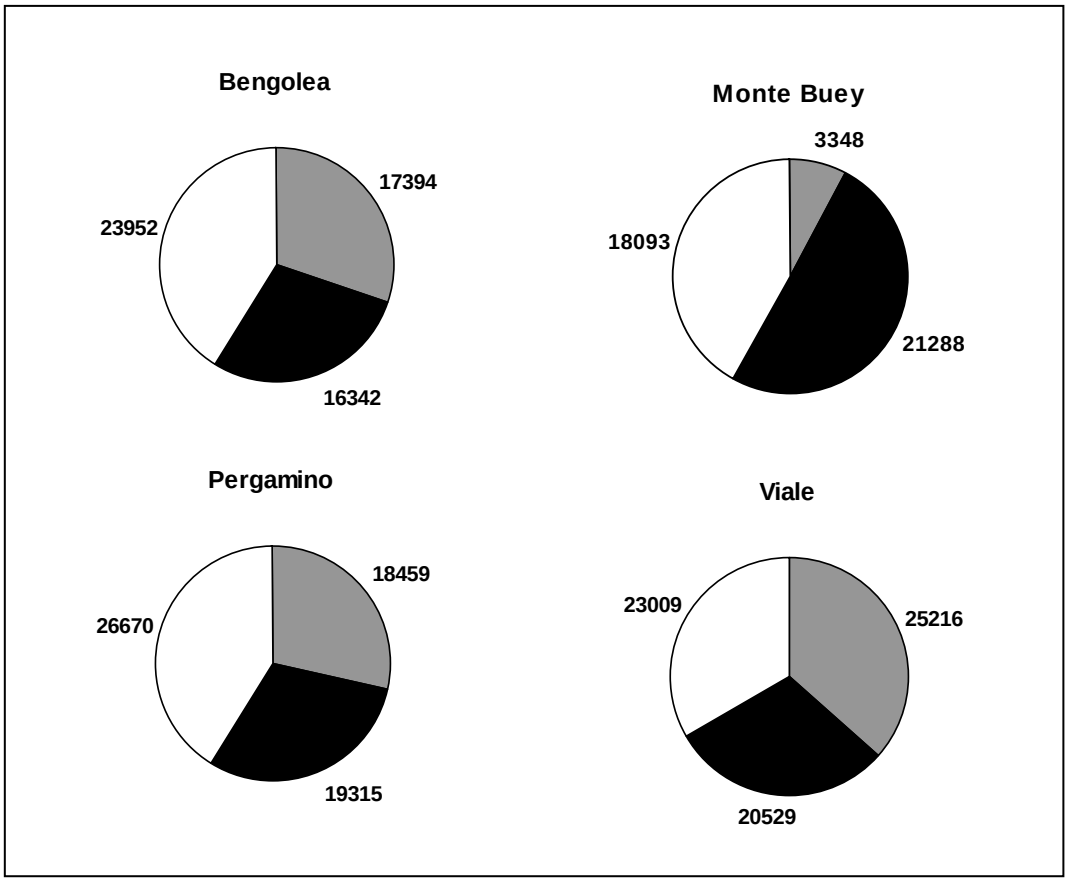

Fig. 4.2: Numero de secuencias obtenidas para cada una de las muestras de agosto de 2009. Los valores corresponden al total de secuencias clasificadas como bacteria después de eliminar todas las secuencias detectadas como defectuosas o quiméricas. Gris: Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

La información surgida del análisis del muestreo de agosto de 2009 permitió tener un panorama muy completo de cuales eran las especies bacterianas presentes y en que proporciones se encontraban en cada muestra. También se utilizó para calcular distintos parámetros de diversidad, como la rarefacción y el índice de Shannon, que aportan información acerca de la conformación de las poblaciones de bacterias, teniendo en cuenta los valores de abundancia y riqueza de especies. Debido a que para los organismos procariotas el concepto de especie es difícil de aplicar, generalmente es conveniente utilizar valores de similaridad o disimilaridad entre secuencias para agruparlas en unidades operables (OTUs). Está generalmente aceptado que valores de disimilitud del 3% corresponden a diferencias a nivel de especie, mientras que por ejemplo, 5% y 20% corresponden a diferencias entre géneros y filos respectivamente (Schloss 2005).

Utilizando los valores de disimilitud entre secuencias, se construyeron curvas de rarefacción que sirven como indicadores de diversidad y del grado de cobertura obtenido en las diferentes muestras. En todos los casos puede verse que a pesar de tener una gran cantidad de secuencias no se alcanzó un valor constante o "*plateau*" en el número de OTUs, sugiriendo que para lograr la cobertura de la mayoría de las especies en la comunidad el número de secuencias muestreadas debería ser aún mayor (Fig 4.3).

Considerando que en algunos de los casos se obtuvieron más de 9.000 OTUs (3% disimilaridad), se obtiene una idea de la cantidad de posibles diferentes especies de bacterias que componen estas poblaciones en los suelos.

A partir de la información disponible en las secuencias se obtuvo el número de OTUs y la cantidad de secuencias que contiene cada uno de ellos. Estos datos de abundancia y riqueza sirven para calcular distintos índices de diversidad. En ecología microbiana uno de los más difundidos es el Índice de Shannon. El valor de este índice puede verse afectado por el tamaño de la muestra: un mayor número de secuencias en una muestra puede resultar un mayor valor de diversidad solo por diferencias en el grado de cobertura del muestreo. Para evitar este problema y poder comparar las poblaciones se utilizaron gráficos de curvas colectoras que muestran como evoluciona el valor del índice a medida que aumenta el número de secuencias (Fig. 4.4).

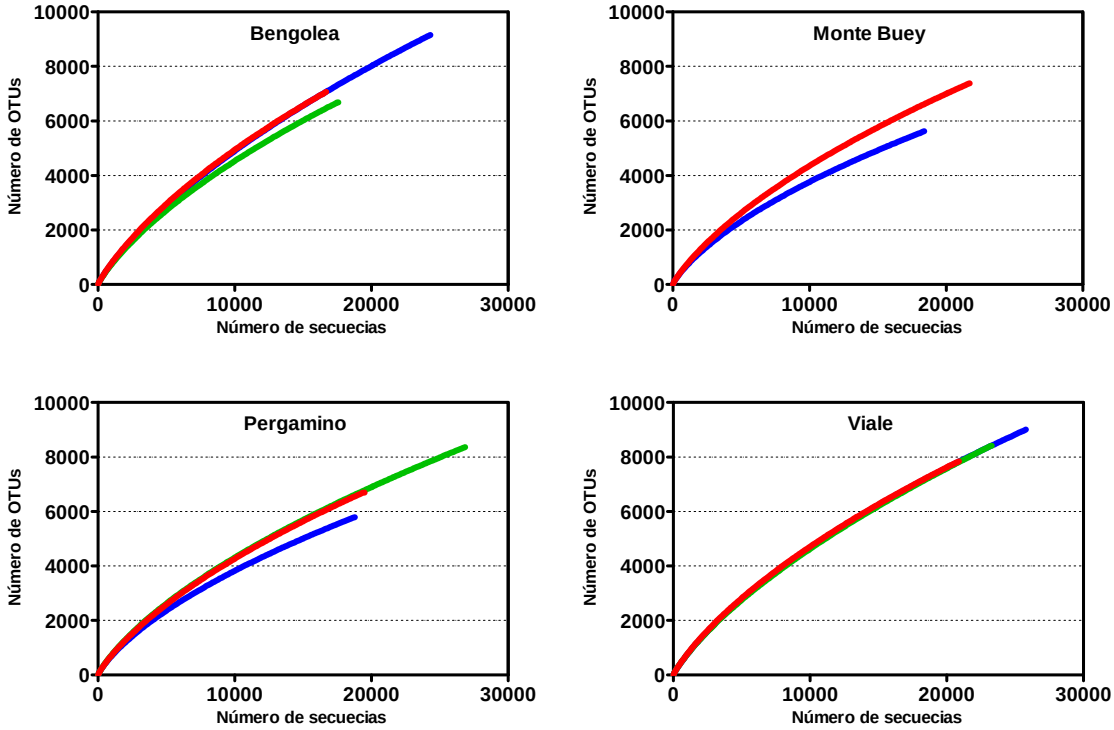

Fig. 4.3: Curvas de rarefacción de todas las secuencias de bacteria calculadas en base al 3% de disimilaridad entre secuencias. Verde: Natural, rojo: Malas Prácticas y azul: Buenas Prácticas.

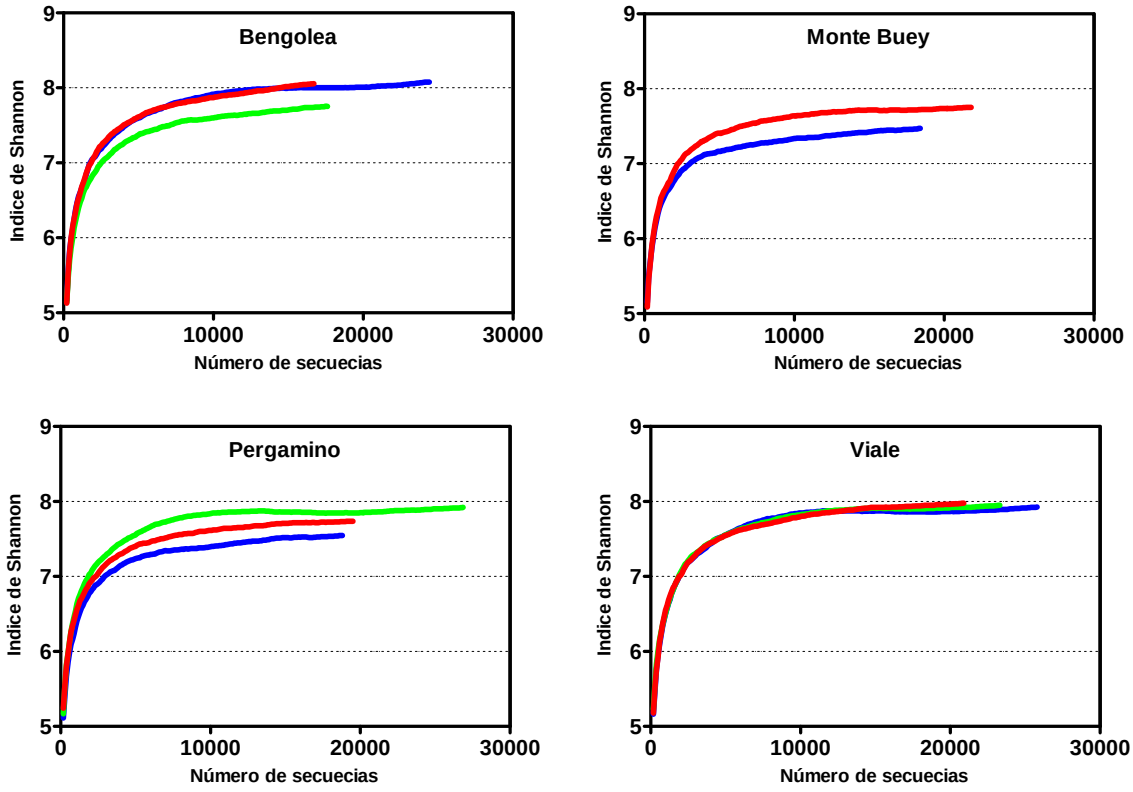

Fig. 4.4: Índice de Shannon de todas las muestras calculados en base al 3% de disimililaridad. Verde: Natural, rojo: Malas Prácticas y azul: Buenas Prácticas.

Para todas las muestras puede verse que el valor aumenta rápidamente y se estabiliza en valores relativamente constantes a partir de las 10.000 secuencias. Todas las muestras se encuentran en un rango de valores entre 7,4 y 8 y ninguno de los sitios mostró diferencias considerables en la diversidad. Tampoco se distingue un patrón de mayor o menor valor asociado al tipo de manejo. Sin embargo, al comparar los valores del índice, las Buenas Prácticas nunca son mayores a las Malas Prácticas en cada sitio.

Una de las características más interesantes que permite analizar la técnica de pirosecuenciación, debido a su poder resolutivo a nivel de secuencias, es la composición taxonómica de las comunidades. Mediante la herramienta de clasificación de secuencias de RDP (Wang 2007), se encontró que la mayoría de las secuencias pertenecen a los filos Proteobacteria (principalmente la clase alfaproteobacteria), Actinobacteria y Acidobacteria, y en menor medida a Firmicutes, Bacteroidetes, Chloroflexi y Planctomycetes. Y aproximadamente entre un 10% y 19% de bacterias no pudieron ser clasificadas en ninguno de los taxones conocidos (Fig. 4.5).

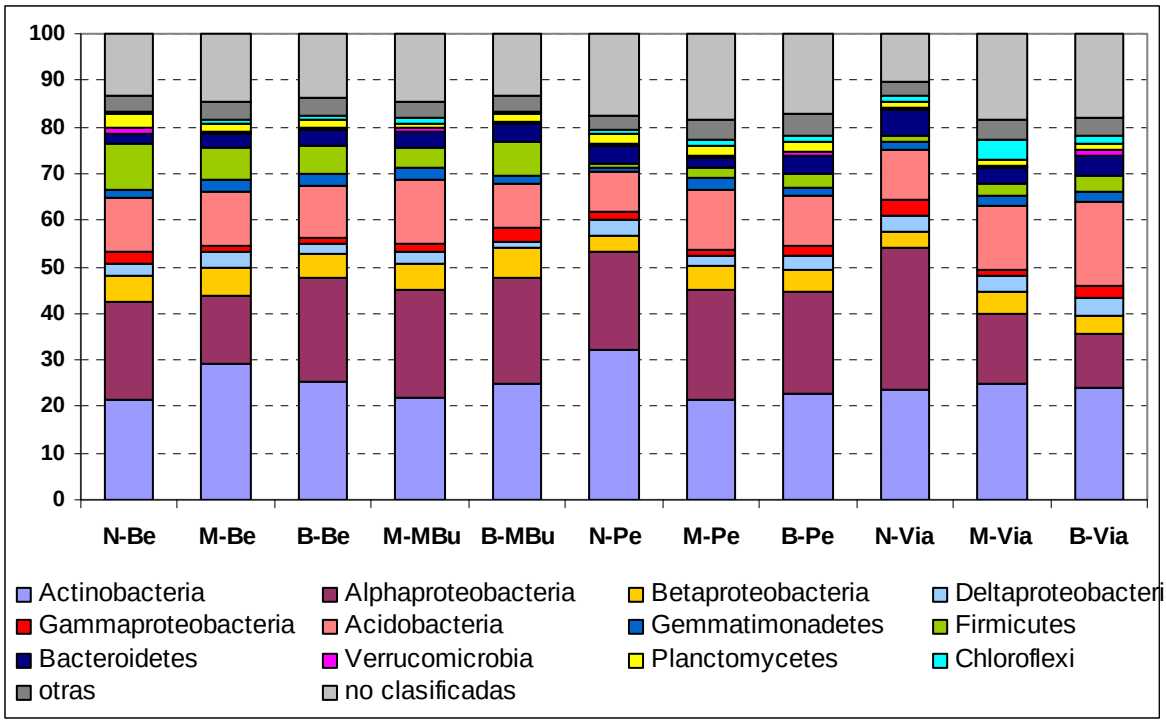

Fig. 4.5: Frecuencias acumuladas de los distintos grupos de bacterias determinados por pirosecuenciación para las distintas muestras. No está incluida la muestra natural de M. Buey. Los grupos corresponden a los filos mas abundantes, a excepción de proteobacteria que se desglosó en las cuatro clases mayoritarias. N: Natural, M: Malas Prácticas, B: Buenas Prácticas, Be: Bengolea, MBu: Monte Buey, Pe: Pergamino y Via: Viale.

Por otro lado, con el fin de determinar y comparar la abundancia en las distintas muestras de los grupos mayoritarios de bacterias se determinaron sus proporciones en cada muestra utilizando la técnica de PCR en tiempo real.

En los experimentos de qPCR se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada taxón, previamente diseñados y probados por otros investigadores (Fierer 2005, Blackwood 2005, Gich 2001, Phillipot 2009) en estudios similares sobre suelos. Estos oligonucleótidos fueron utilizados en combinación con otros cebadores universales para el dominio Bacteria.

Los valores obtenidos de la cuantificación mostraron que los tres grupos más abundantes en promedio fueron Actinobacteria (21%), Alfaproteobacteria (16%) y Acidobacteria (4,5%). Mientras que los grupos Gemmatimonadetes, Firmicutes, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Betaproteobacteria, Bacteroidetes y Planctomycetes contribuyen en menor medida al total de la comunidad (Fig. 4.6).

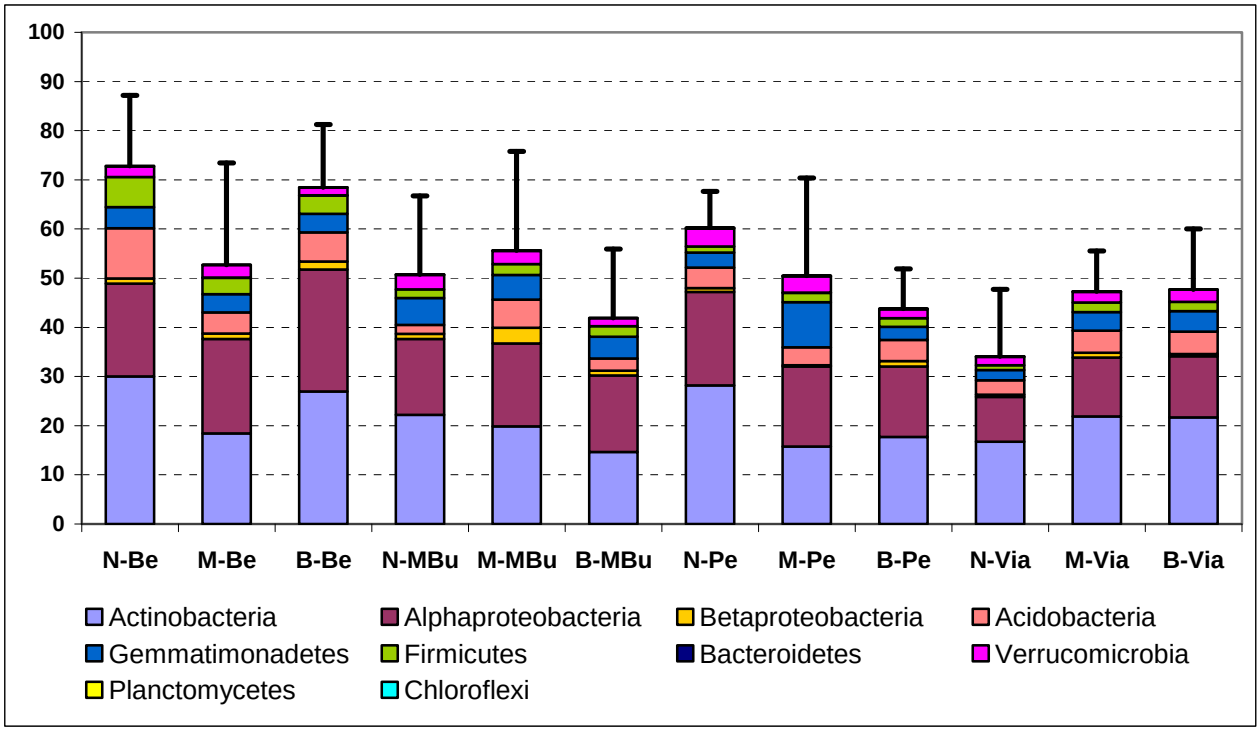

Fig. 4.6: Porcentaje de bacterias de los principales grupos con respecto al total determinados mediante qPCR para el muestreo de Agosto 2009. Las barras representan el error estándar de todos los grupos combinados. N: Natural, M: Malas Prácticas, B: Buenas Prácticas, Be: Bengolea, MBu: Monte Buey, Pe: Pergamino y Via: Viale.

Estos datos, corroboran los resultados de la pirosecuenciación, que muestran proporciones similares sobre el total de secuencias obtenidas. Probablemente la discrepancia entre las cantidades observadas de Acidobacterias entre los datos de pirosecuenciacion y qPCR se deba a los distintos cebadores utilizados en ambos experimentos, ya que se ha sugerido que los cebadores específicos para este grupo utilizados en la qPCR no incluyen a la totalidad de miembros de este taxón (Jones 2009).

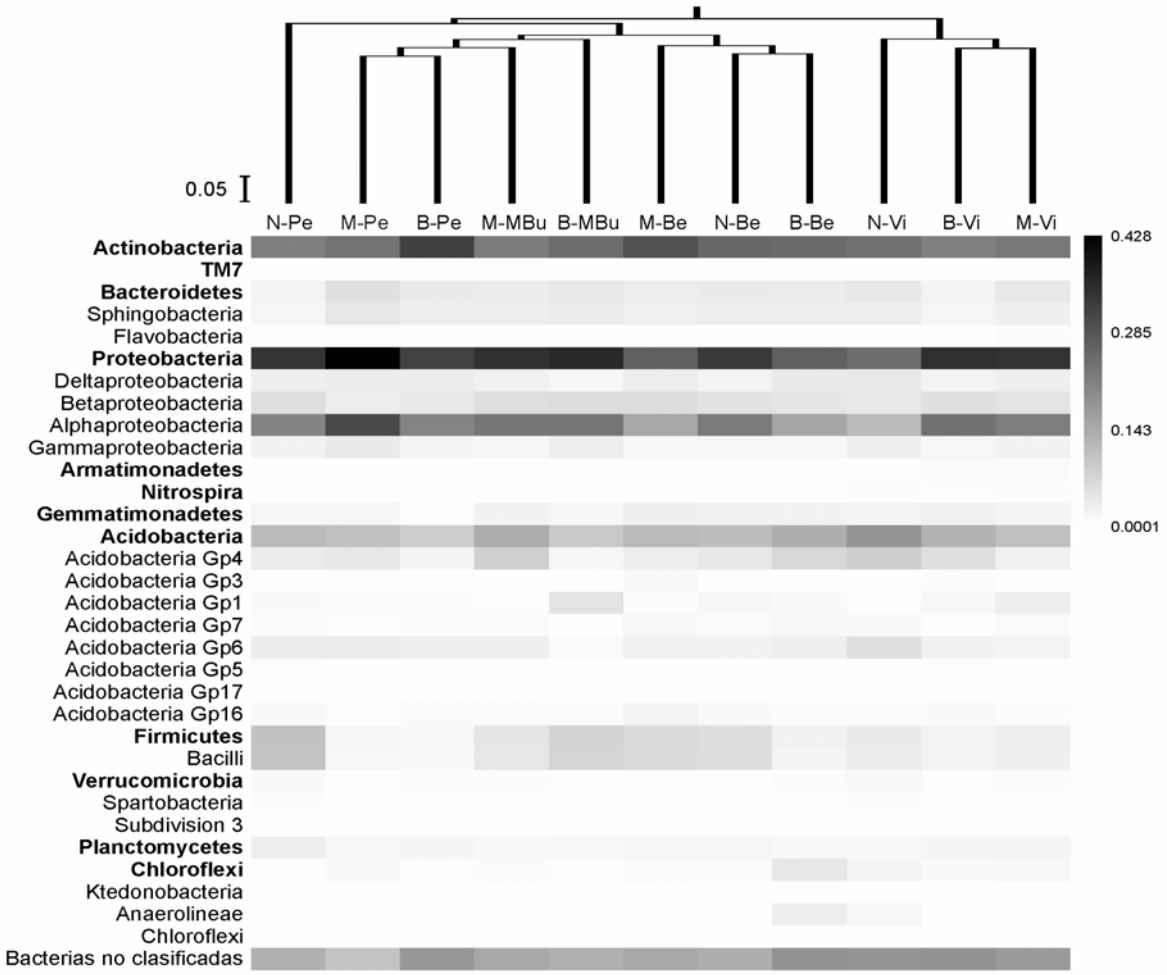

Fig. 4.7: Dendrograma de las muestras agrupadas mediante el algoritmo UPGMA y distancias de similaridad de Bray-Curtis. Las secuencias están agrupadas en OTUs al 3%. La matriz muestra las abundancias relativas de los taxones con más secuencias organizadas en clases dentro del filo correspondiente (resaltado en negrita). En la última línea se encuentran las bacterias no clasificadas. La clasificación de los taxones corresponde a la de RDP con valores de bootstrap mínimos de 80% (Wang 2007). La escala de grises representa la proporción de los grupos respecto del total de secuencias de bacterias en cada una de las muestras. N: Natural, M: Malas Prácticas, B: Buenas Prácticas, Be: Bengolea, MBu: Monte Buey, Pe: Pergamino y Via: Viale.

La información que surgió de los análisis de pirosecuenciación también permitió comparar las muestras entre sí desde el punto de vista de su composición, e identificar relaciones debidas a las características específicas de cada sitio y manejo del suelo.
Para esto se clasificaron las secuencias en OTUs con un valor de disimilaridad del 3%. Con esta clasificación se calcularon las diferencias entre muestras (distancias), teniendo en cuenta no solo la presencia y ausencia de OTUs, sino también la abundancia relativa de cada uno (distancia de Bray-Curtis). Posteriormente se construyó un dendograma de las muestras utilizando el algoritmo de agrupamiento UPGMA (Fig. 4.7).
Claramente se formaron tres "clusters", donde en uno se separaron las muestras de Viale, y dos más separando las de Bengolea del resto, quedando por fuera de estos grupos el ambiente natural de Pergamino. Este agrupamiento por similaridad en la composición taxonómica de las poblaciones sugiere que existe un mayor grado de similitud entre muestras debida a las características del sitio que a efectos de los distintos manejos agrícolas (tratamientos).

Principales grupos de bacterias

Como se mencionó anteriormente, muchas veces la diversidad por sí sola no tiene directa relación con las características del medio ambiente. Sin embargo, el número de bacterias, o las variaciones en la cantidad de un determinado grupo o taxón, pueden estar relacionadas con factores específicos que definen a los diferentes ambientes. Por ello se analizó el cambio producido con el paso del tiempo y las distintas estaciones (verano e invierno), en donde una de las diferencias principales era la presencia o ausencia de cultivos, para la dinámica de las poblaciones de bacterias a lo largo de dos años consecutivos.

Una de las maneras más simple y eficiente de analizar diferencias genéticas entre comunidades o variaciones temporales es mediante la técnica de DGGE. Uno de los problemas que presenta esta técnica en el análisis de muestras de suelos es que al haber un gran número de especies distintas la capacidad de resolución del DGGE no es suficiente para ver diferenciar entre muestras "saturadas" de amplicones con igual movilidad (velocidad de desplazamiento en el gradiente desnaturalizante, dependiendo del contenido de guanina y citosina del ADN) (Loisel 2006). Por esta razón fue imposible obtener información mediante DGGE de las comunidades de bacterias totales en las muestras. Sin embargo, frente a este problema, el uso de oligonucleótidos

específicos permitió amplificar selectivamente grupos taxonómicos más reducidos y realizar experimentos de DGGE con suficiente resolución para ver diferencias entre las muestras.

Si bien en principio sería factible comparar las muestras correspondientes a los tres factores que pueden influir en la composición de las poblaciones (Sitio, Tratamiento y Tiempo), corridas en distintos geles con exactamente las mismas condiciones, esto resulta difícil para DGGEs con muchas bandas, y los resultados pueden ser poco confiables. Por lo tanto, los análisis se realizaron agrupando las muestras según distintos criterios, con el objetivo de cubrir todas las combinaciones posibles de las tres variables.

En primer lugar se realizaron tres geles, uno para cada tratamiento (NA, MP y BP), comparando en cada uno de ellos los cuatro tiempos para cada uno de los sitios (Be, MBu, Pe y Via). Con esta combinación pudo verse como cambian las poblaciones con el paso del tiempo, y a la vez, las diferencias entre sitios para un mismo tratamiento. Por otro lado, se compararon los distintos tratamientos agrupados por sitio en un mismo gel, para los distintos muestreos por separado.

Actinobacteria

El grupo de las Actinobacterias es ampliamente reconocido como uno de los filos más abundante, diverso y ampliamente distribuido por la mayoría de los hábitats del planeta (Ventura 2007, Gløckner 2000). En suelos las Actinobacterias son importantes para la degradación de residuos, la formación de la materia orgánica y por la producción de metabolitos secundarios (Paul 2007, DeAngelis 2011). Dentro de este filo los Actinomycetes son un grupo funcionalmente diverso e importante, y su capacidad de formar micelos, al igual que los hongos, les permite rastrear el suelo en busca de agua y nutrientes (Jenkins 2009, Goodfellow 1983).
Partiendo de la información obtenida mediante la pirosecuenciación de las muestras de agosto de 2009, se encontró que este grupo representa al más abundante de todos con más del 25% de secuencias en promedio respecto al total de bacterias. Dentro del grupo la mayoría de las secuencias corresponden a los ordenes Actinomycetales con el 65% y Solirubrobacterales con 14% del total.

Utilizando todas las secuencias de Actinobacterias de cada muestra se calcularon los índices de Shannon para estimar la diversidad del grupo. Como resultado pudo verse que los valores obtenidos no presentaron mayores diferencias entre los distintos tratamientos, e incluso tampoco entre sitios (Fig. 4.8).

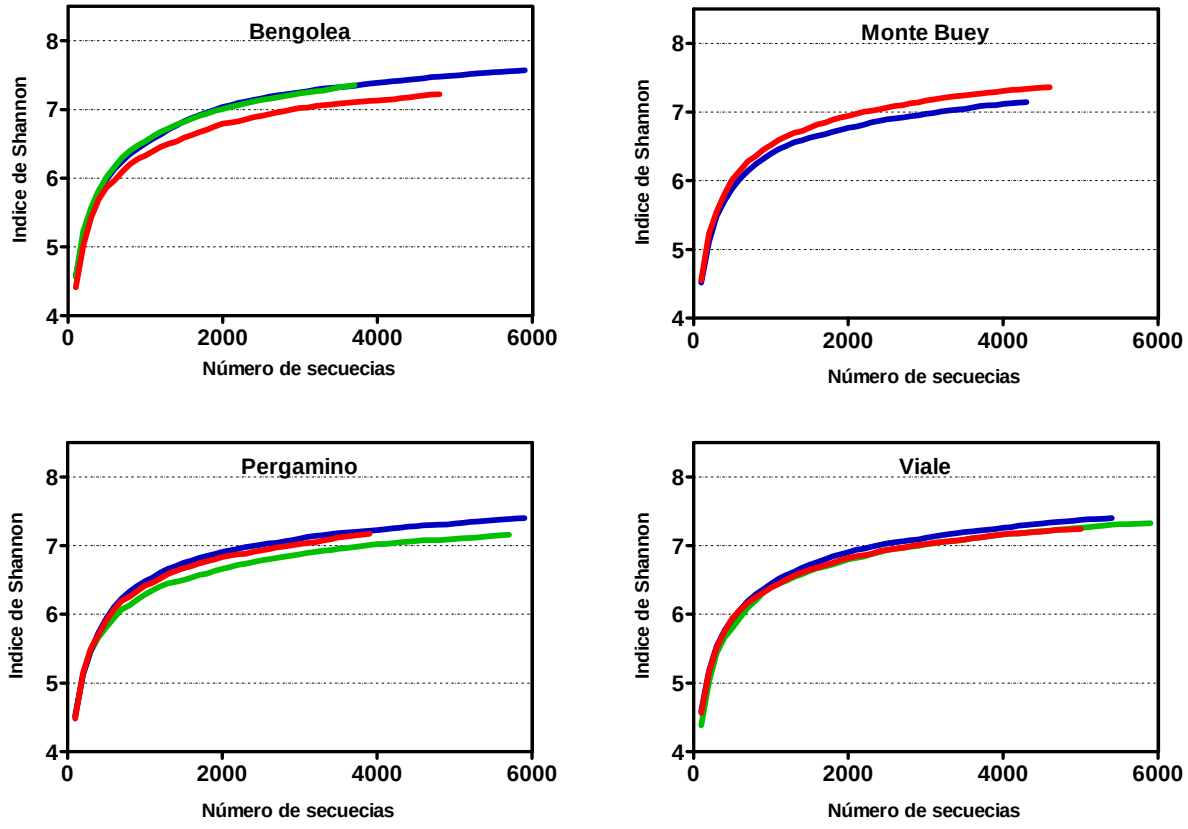

Fig. 4.8: Curvas de acumulación para los valores del Índice de Shannon para el filo Actinobacteria calculados en base a secuencias únicas. Verde: Natural, rojo: Malas Prácticas y azul: Buenas Prácticas.

Con respecto a los datos obtenidos de la cuantificación por qPCR de este grupo mayoritario de bacterias, se encontró que su proporción con respecto al total de bacterias no fue significativamente diferente para ninguna de las variables analizadas que cree pueden influir sobre las poblaciones de estos organismos. Es decir, no se apreciaron efectos sobre la cantidad de bacterias producto de los distintos sitios, tratamientos o estaciones (Fig. 4.9).

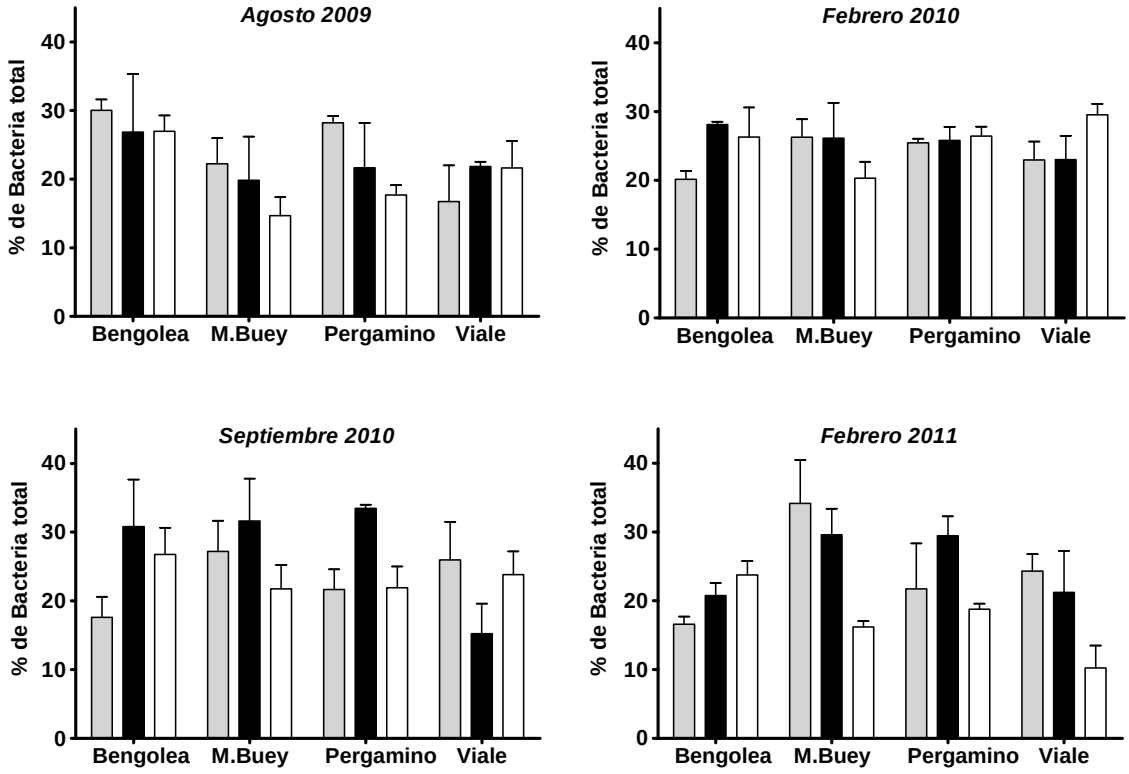

Fig. 4.9: Cuantificación por qPCR del numero de copias del gen ARNr 16S del filo Actinobacteria expresados como porcentaje del total de bacterias. Gris: Ambiente Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

Las comparaciones mediante DGGE para ver variaciones en el perfil de la comunidad durante el periodo de tiempo estudiado muestran que los patrones de bandas e incluso sus intensidades son muy similares para los cuatro tiempos dentro de cada sitio en particular (Fig. 4.10-A). Esto también se ve reflejado en los resultados del ANOSIM (Fig. 4.10-B) por los bajos valores de distancia para cada sitio, en contraste con la comparación entre sitios, que indica diferencias significativas (p=0,0001 para los tres tratamientos).

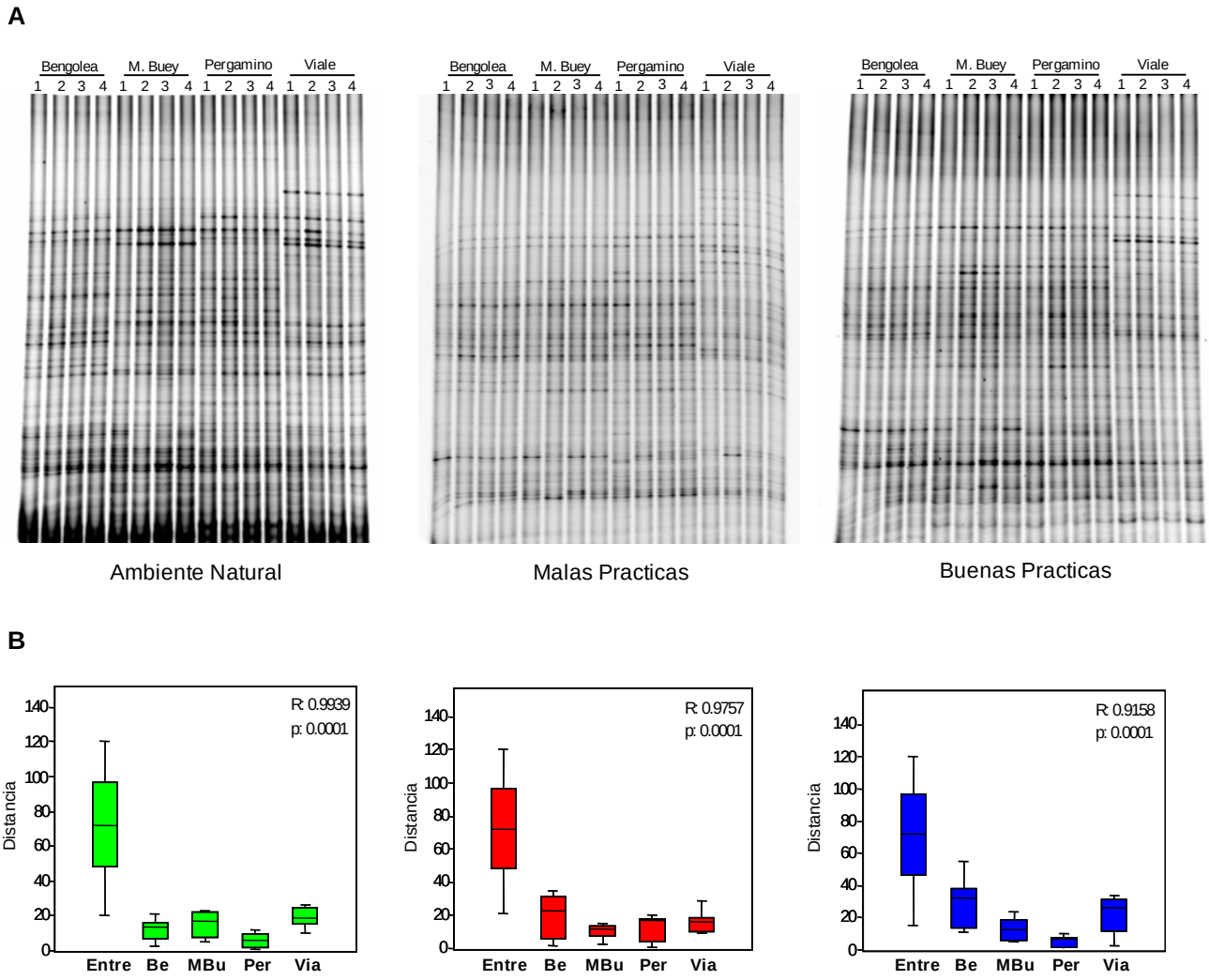

Fig. 4.10: (A) DGGE de Actinobacteria separados por tratamientos. Para cada sitio se muestran los tiempos correspondientes a los cuatro muestreos (1 a 4). (B) Box plot-ANOSIM de los DGGE para cada tratamiento. Los valores de R y p en los análisis corresponden a la comparación entre sitios. Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

En la comparación de los distintos tratamientos y sitios no puede verse un patrón de bandas particulares que distinga los diferentes manejos. Según los resultados de ANOSIM (Fig 4.11-B), las distancias entre las muestras de un mismo tratamiento no son significativamente diferentes a las distancias entre tratamientos. Por otro lado, las muestras de un mismo sitio son altamente similares. Esto puede verse en los resultados del ANOSIM (Fig 4.11-C) donde las distancias indican diferencias significativas entre sitios (p=0,0006).

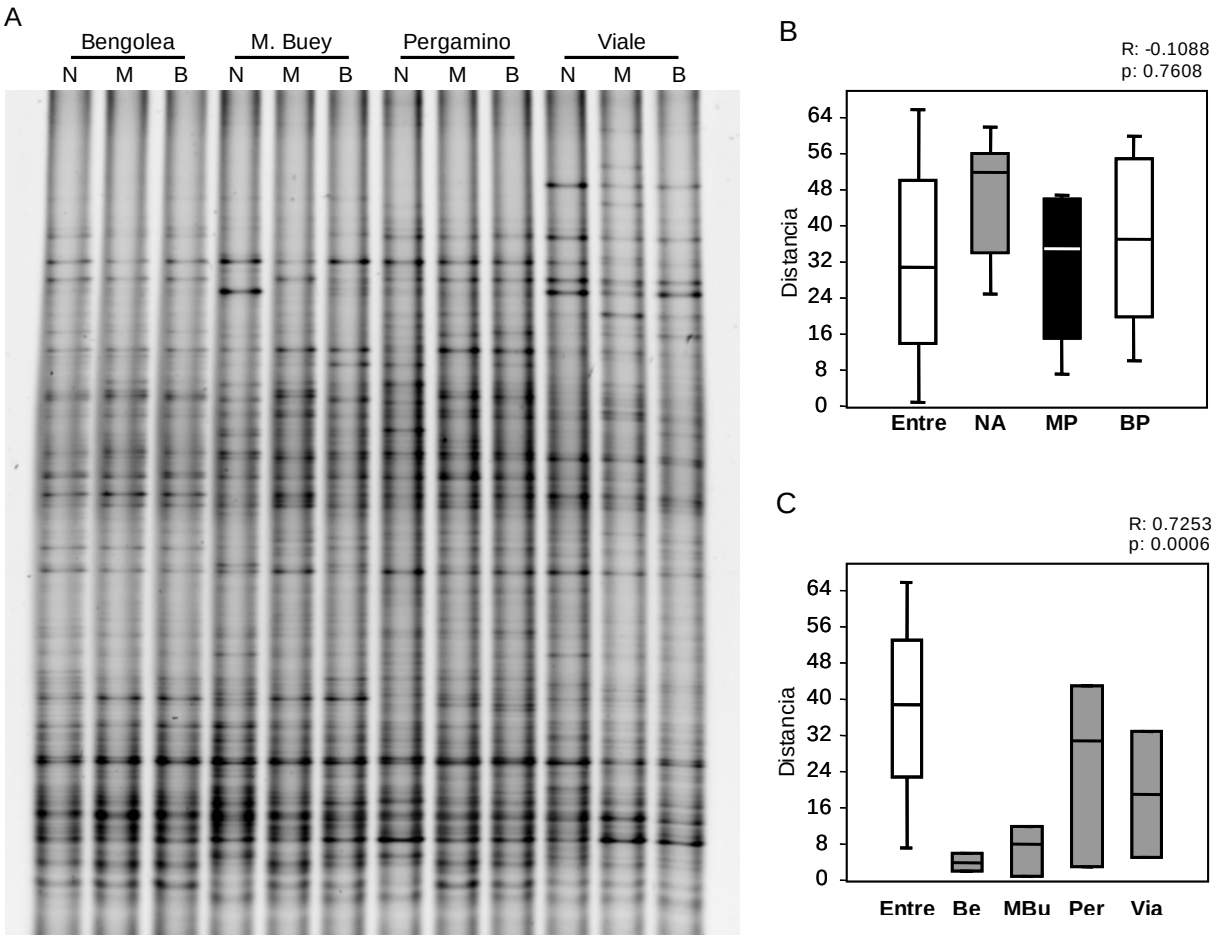

Fig. 4.11: (A) DGGE de Actinobacteria para el muestreo 4. N: Ambiente Natural, M: Malas Prácticas y B: Buenas Prácticas. (B y C)Box plot- ANOSIM comparando tratamientos y sitios respectivamente. Los valores de R y p corresponden a la comparación entre tratamientos (B) y entre sitios (C). Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

Acidobacteria

El filo Acidobacteria incluye varias clases muy abundantes en suelos. Este grupo es uno de los taxones más difíciles de aislar y cultivar, por lo cual su función tanto en suelos como en otros ambientes es aún desconocida. Según los datos de pirosecuenciación, los géneros más numerosos pertenecen a este filo, con Gp4 representando alrededor del 38% del total de Acidobacterias, Gp6 más del 23%, Gp1 10%, Gp16 8% y Gp7 7%. En cuanto a su diversidad, se encontró que según los valores de los índices de Shannon hay grandes variaciones entre los distintos sitios y tratamientos. Sin embargo, no se distingue un patrón que diferencie a las distintas muestras según las variables analizadas (Fig. 4.12).

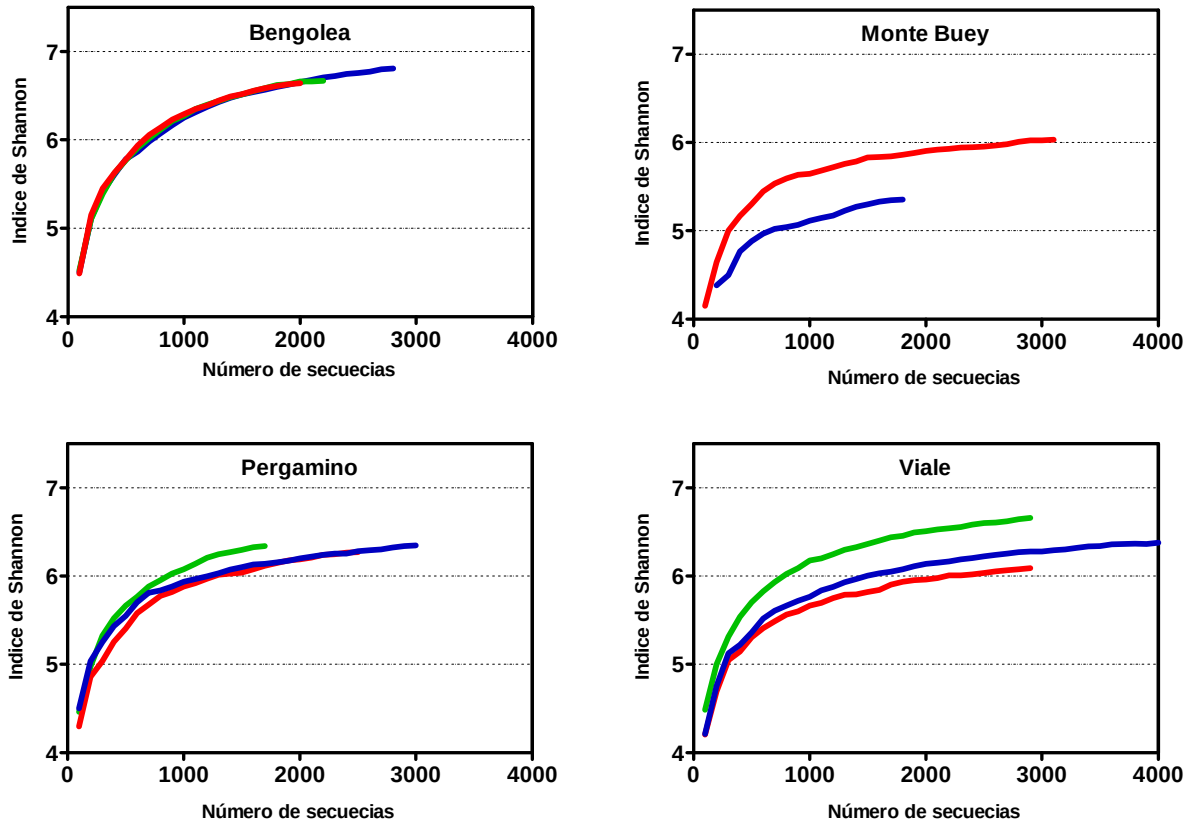

Fig. 4.12: Curvas de acumulación para los valores del Índice de Shannon para el filo Acidobacteria calculados en base a secuencias únicas. Verde: Natural, rojo: Malas Prácticas y azul: Buenas Prácticas.

Es llamativa la diferencia entre MP y BP en Monte Buey, donde el valor para BP es el más bajo de todos. Además Monte Buey presenta los valores más bajos de diversidad por sitio. Mientras que en el caso opuesto, en Bengolea se observan los valores más altos e idénticos entre tratamientos. Esta baja diversidad en las buenas prácticas de Monte Buey podría explicarse por la gran cantidad de secuencias del grupo Acidobacteria Gp1 encontradas en esta muestra, donde casi el 50% del total pertenece a este único género.

La cuantificación del número de copias de gen ARNr 16S para este filo no mostró variaciones significativas a lo largo del tiempo que tengan relación con los sitios y/o tratamientos. Sin embargo se observaron diferencias significativas para las distintas temporadas ($p<0,0001$) (Fig. 4.13).

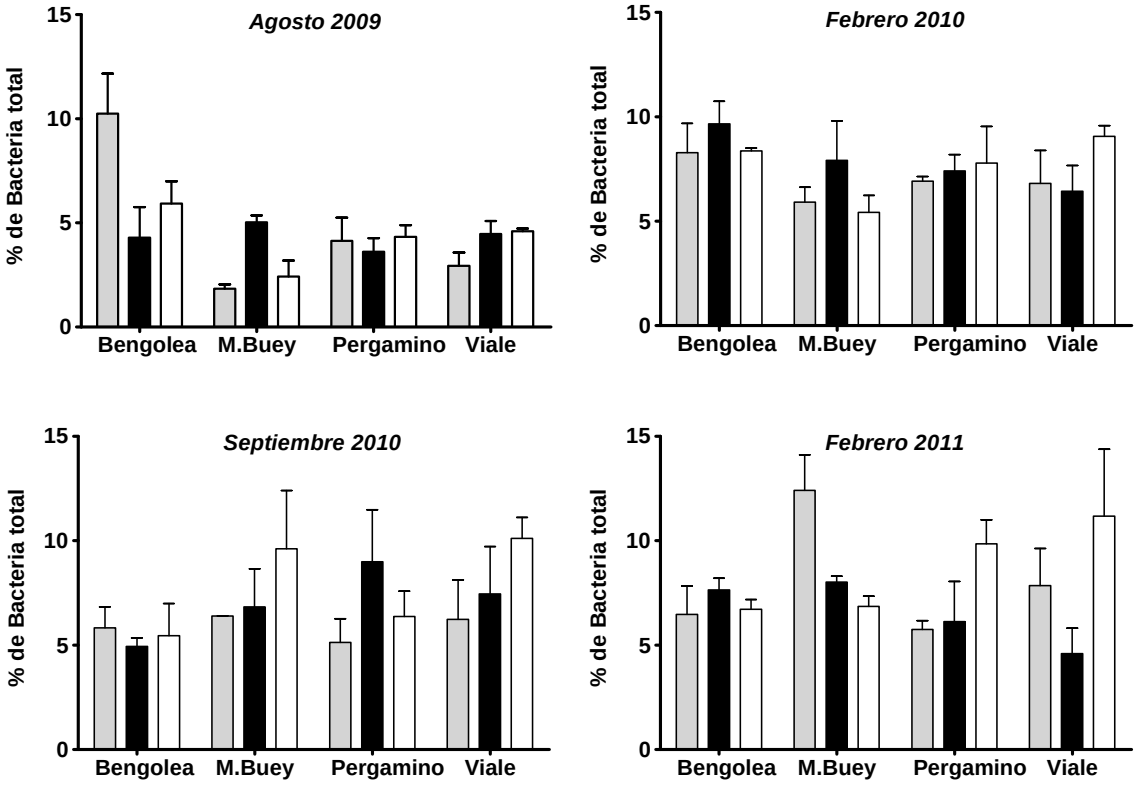

Fig. 4.13: Cuantificación por qPCR del numero de copias del gen ARNr 16S del filo Acidobacteria expresados como porcentaje del total de bacterias. Gris: Ambiente Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

El análisis mediante DGGE de la variación del filo Acidobacteria en el tiempo muestra que existen diferencias entre los sitios, mientras que la estructura de la comunidad se mantiene estable en todos los sitios entre el primer y último muestreo. Estas observaciones se corroboraron por los resultados significativos del ANOSIM (Fig. 4.14-B). En el caso del gel de MP se encontró que las distancias entre sitios resultaron menores que las observadas en NA y BP para la misma comparación. Esto estaría diciendo que las MP de los distintos sitios son más similares entre sí que los otros tratamientos. En la siguiente figura (Fig. 4.15) esto se hace más evidente al comparar los tratamientos entre sí. El grafico de ANOSIM entre tratamientos muestra que si bien las diferencias no son significativas, las distancias dentro del grupo de MP son mucho menores que en los otros tratamientos, y pruebas a post-hoc entre pares de grupos para el ANOSIM mostraron diferencias significativas entre MP y BP (p= 0.0268) (Fig. 4.15-B).

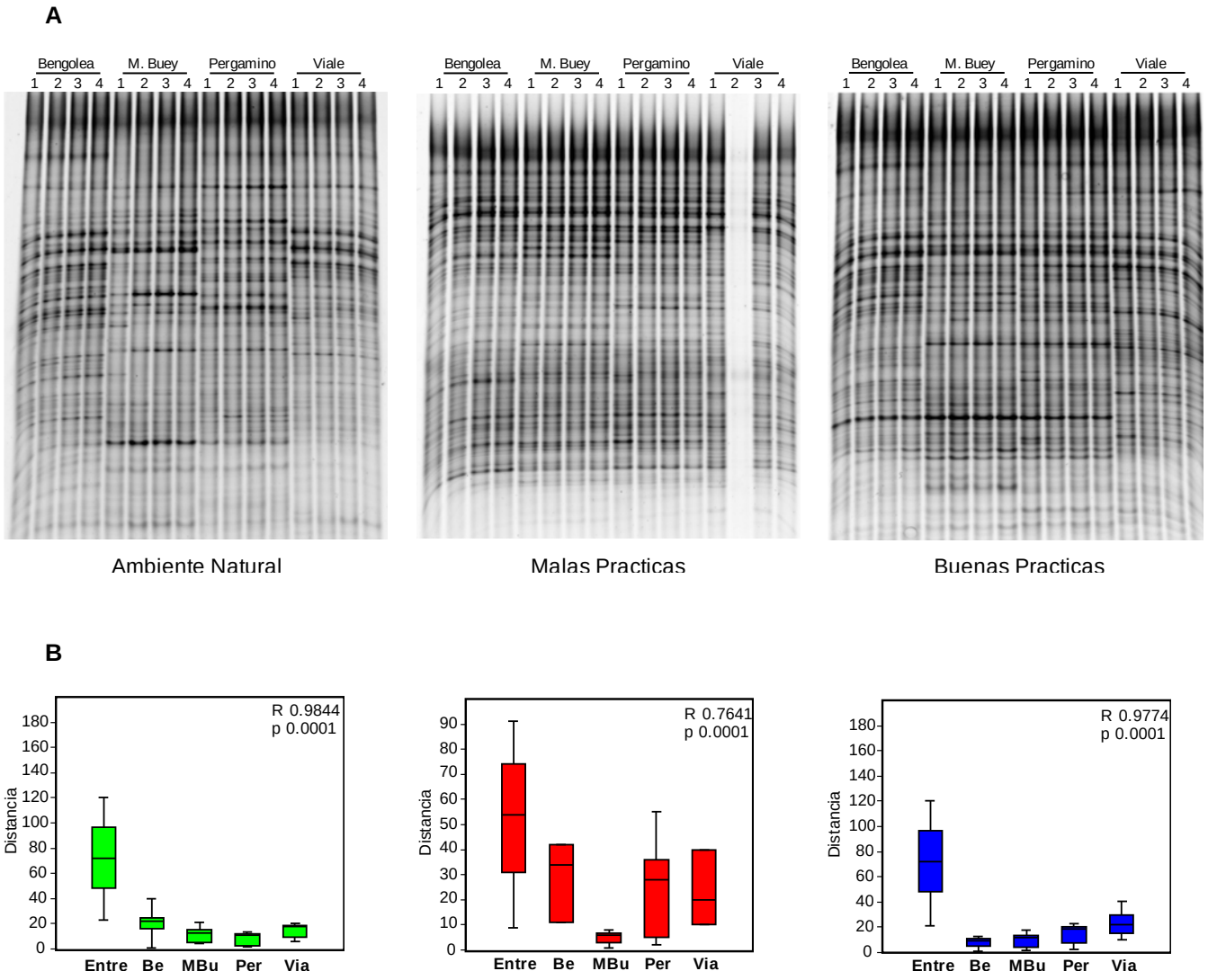

Fig. 4.14: (A) DGGE de Acidobacteria separados por tratamientos. Para cada sitio se muestran los tiempos correspondientes a los cuatro muestreos (1 a 4). (B) Box plot-ANOSIM de los DGGE para cada tratamiento. Los valores de R y p en los análisis corresponden a la comparación entre sitios. Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

Estos datos sugieren que los efectos de tratamiento estarían disminuyendo la variabilidad en las MP, generando que el perfil de estas muestras sea muy similar independientemente del sitio.

En el caso de las diferencias observadas entre sitios (Fig. 4.15-C) podemos ver que claramente el lugar donde existe menor variación producto de los tratamientos es Bengolea, y en segundo lugar Viale. A pesar de los valores más altos para los otros dos grupos, donde las diferencias producto de los tratamientos son más marcadas, existe una diferencia significativa entre sitios (p=0,0082).

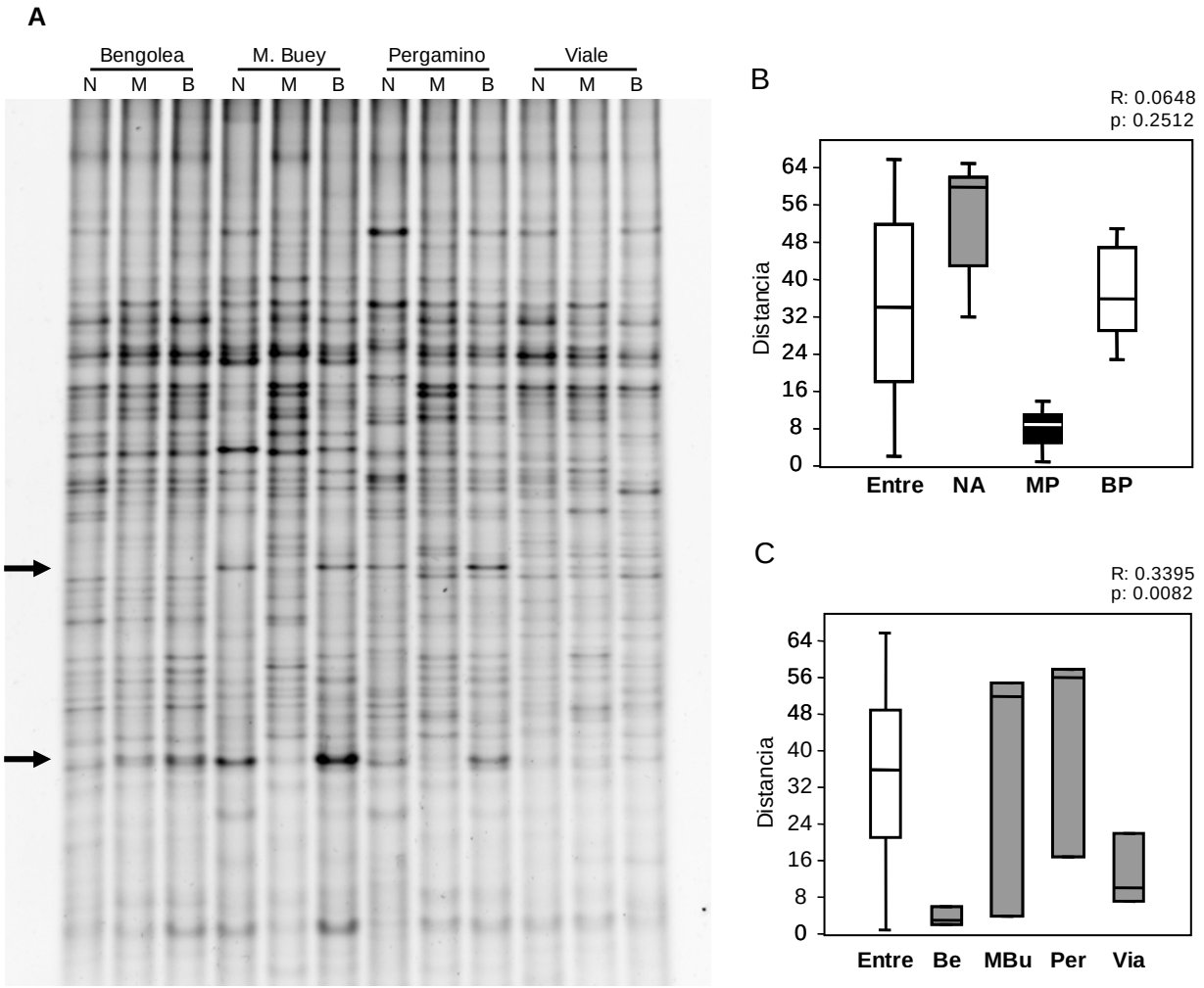

Fig. 4.15: (A) DGGE de Acidobacteria para el muestreo 4. N: Ambiente Natural, M: Malas Prácticas y B: Buenas Prácticas. (B y C) Box plot-ANOSIM comparando tratamientos y sitios respectivamente. Los valores de R y p corresponden a la comparación entre tratamientos (B) y entre sitios (C). Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

En el gel de la figura 4.16 puede verse que algunas bandas (marcadas con flechas) solo aparecen, o lo hacen con mayor intensidad en las muestras NA y BP, y más claramente en los sitios de Monte Buey y Pergamino. Estas bandas fueron tomadas del gel, reamplificadas y secuenciadas para determinar su filogenia. Los resultados de la secuenciación y clasificación determinaron que se trata de bacterias de la clase Acidobacteria Gp1 (Fig. 4.15-A-flechas). Estos resultados estarían en concordancia con la información obtenida por pirosecuenciación que indica que las bacterias de esta clase son más abundantes en las buenas prácticas que en las malas prácticas, excepto para Viale, donde sucede lo contrario (Fig. 4.7).

Alfaproteobacteria

Este grupo en suelos se caracteriza principalmente por incluir a las bacterias simbiontes fijadoras de N_2 asociadas a diferentes especies vegetales, y a grupos de nitrificantes importantes en los suelos como es el genero *Nitrobacter*. Los resultados de pirosecuenciación indicaron que alrededor del 60% de las secuencias de la clase Alfaproteobacteria corresponden al orden Rhizobiales y mayormente al género *Bradyrhizobium*, con muy pocas secuencias de *Nitrobacter* (<0,01%). El resto de la clase estaba compuesta principalmente por bacterias de los ordenes Rhodospirillales (15%) y Sphingomonadales (5%). Alrededor de un 15% de secuencias de Alfaproteobacteria quedaron sin clasificar.

En cuanto a la diversidad de esta clase de Proteobacterias, no se encontraron diferencias entre los distintos sitios, ni tampoco efectos producto de los diferentes manejos. Los únicos valores que se alejaron de la media fueron el ambiente natural de Pergamino, con un valor más bajo que el resto, y las malas prácticas de Viale, donde el valor es el más alto observado (Fig. 4.16).

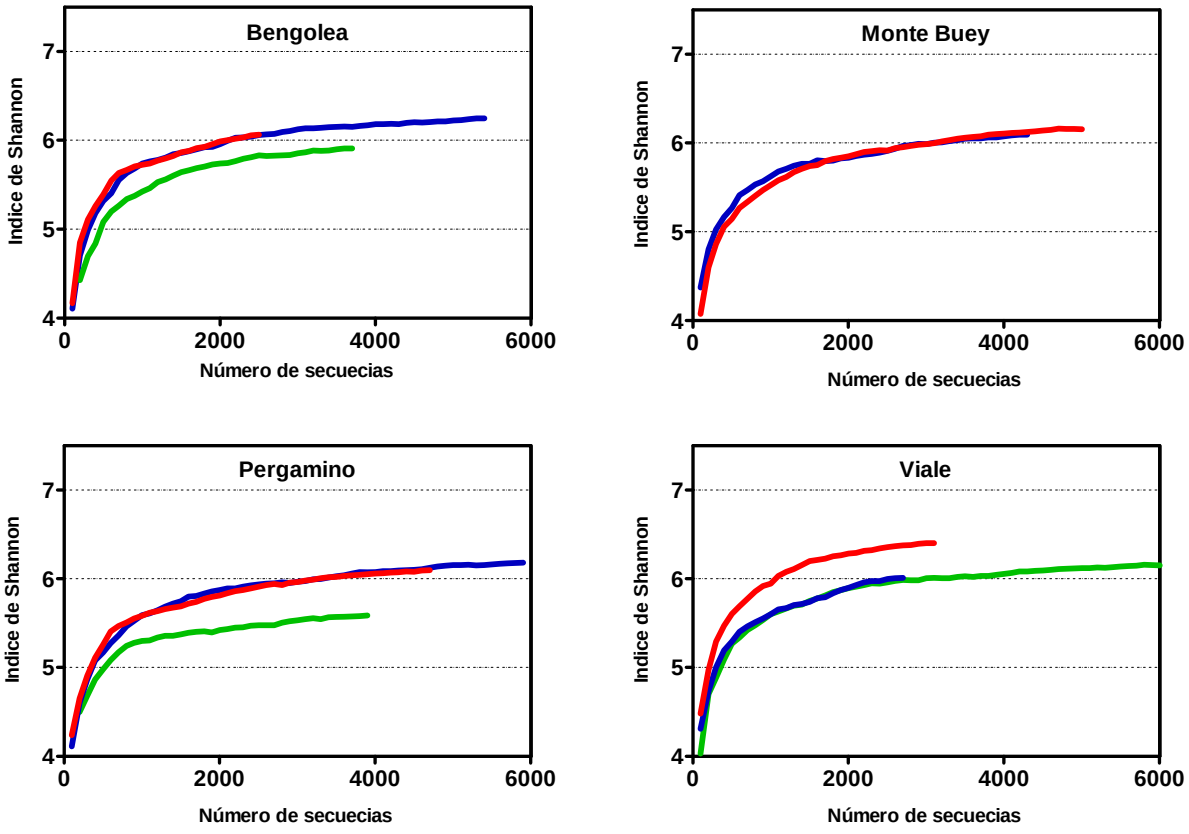

Fig. 4.16: Curvas de acumulación para los valores del Índice de Shannon para la clase Alfaproteobacteria calculados en base a secuencias únicas. Verde: Natural, rojo: Malas Prácticas y azul: Buenas Prácticas.

La cuantificación mediante qPCR de las Alfaproteobacterias solo mostró diferencias significativas respecto a los sitios (p=0,0036). La comparación de medias dio como resultado que las muestras de Viale fueron significativamente diferentes del resto (Fig. 4.17). A pesar de esta diferencia, puede verse que los valores obtenidos en todos los muestreos fueron similares entre los distintos sitios y tratamientos, sugiriendo que se trata de un filo poco variable.

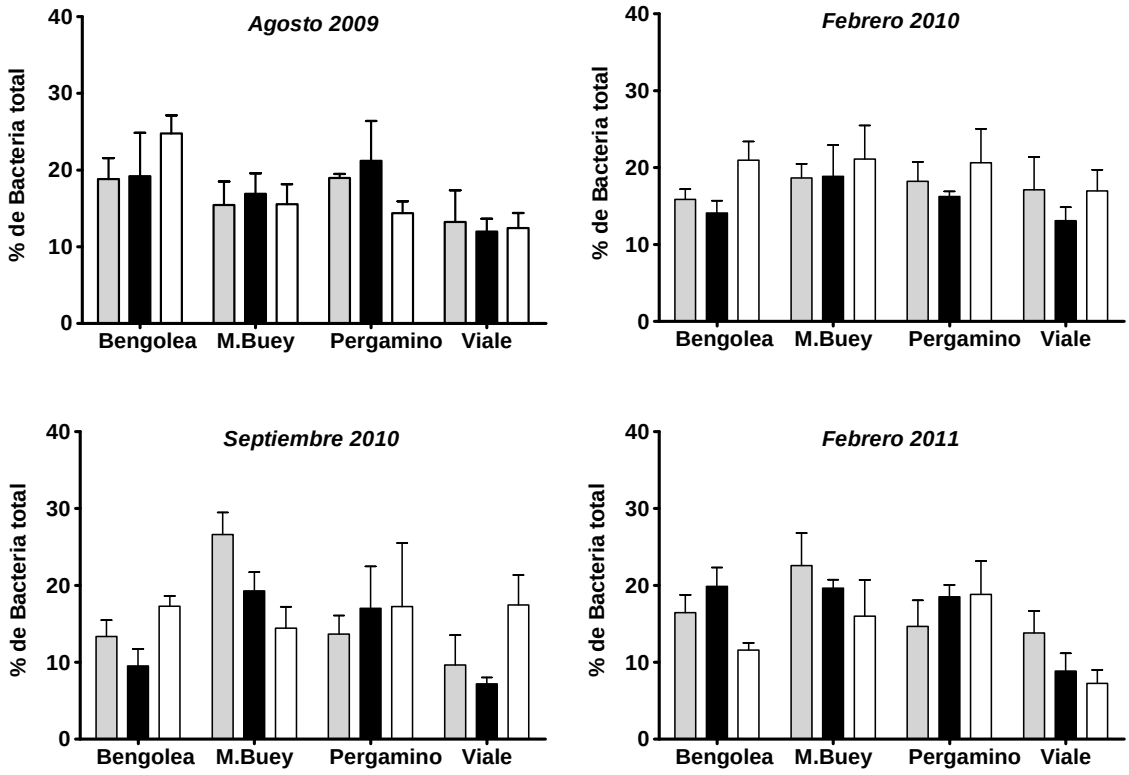

Fig. 4.17: Cuantificación por qPCR del numero de copias del gen ARNr 16S de la clase Alfaproteobacteria expresados como porcentaje del total de bacterias. Gris: Ambiente Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

Los análisis mediante DGGE del perfil de las comunidades en los distintos sitios, tratamientos y tiempos mostraron gran similitud entre todas las muestras. A grandes rasgos pueden verse patrones similares, donde algunas bandas de mucha intensidad son dominantes en todas las muestras. No obstante, los resultados de la comparación por ANOSIM muestran que en tres geles distintos separando los tratamientos existen diferencias entre los sitios agrupados por tiempo (Fig. 4.18).

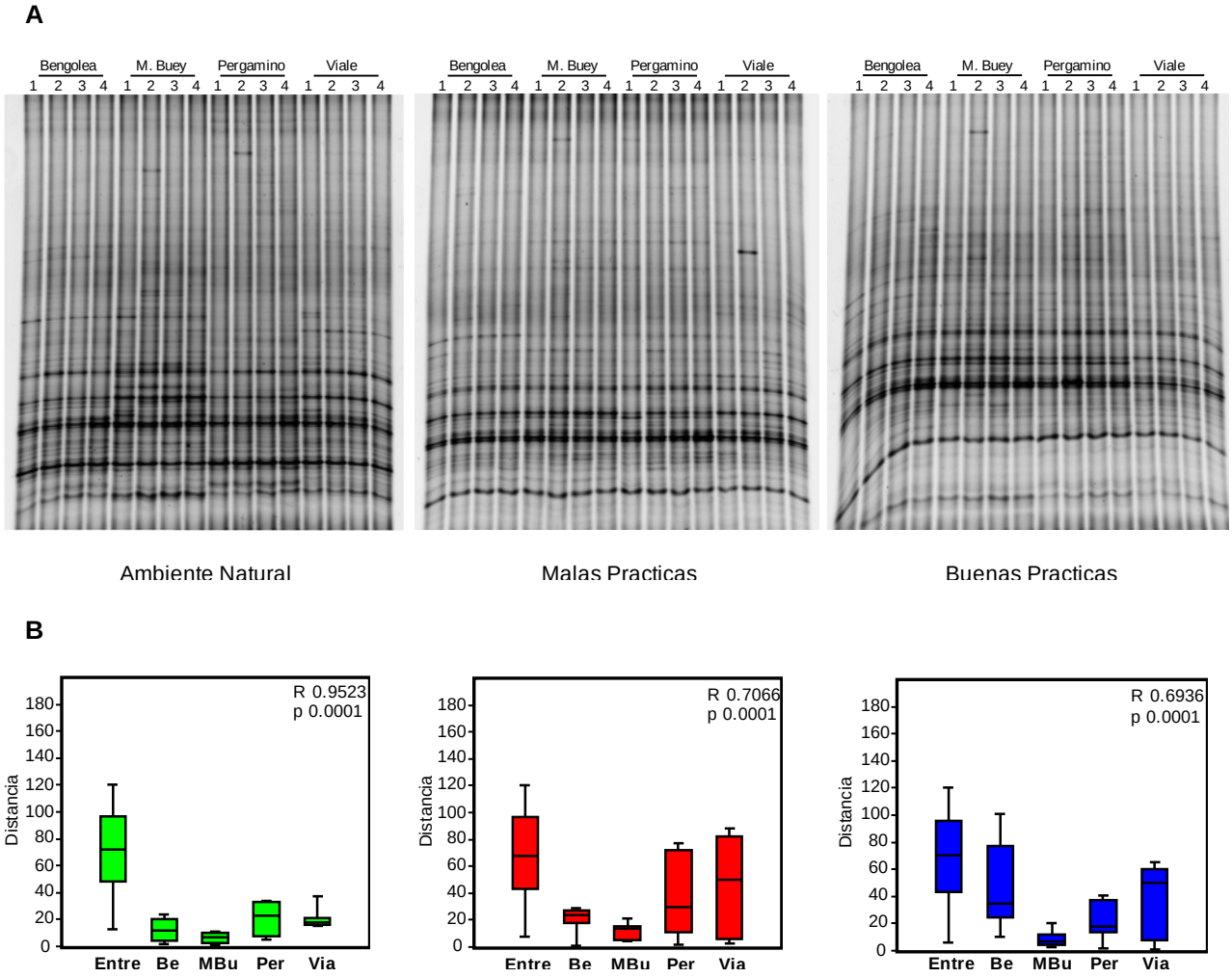

Fig. 4.18: (A) DGGE de Alfaproteobacteria separados por tratamientos. Para cada sitio se muestran los tiempos correspondientes a los cuatro muestreos (1 a 4). (B) Box plot-ANOSIM de los DGGE para cada tratamiento. Los valores de R y p en los análisis corresponden a la comparación entre sitios. Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

Por otro lado, cuando se compararon los efectos de sitio y manejo agrícola para el muestreo de Febrero de 2011 (Fig. 4.19-A) se encontró que tanto para los tratamientos (Fig. 4.19-B) como para los sitios (Fig. 4.19-C) no hubo diferencias significativas entre la estructura de las Alfaproteobacterias. Esto indica que cuando se comparan las muestras según el arreglo de la figura 4.20, la similitud (distancias) dentro de cada grupo es similar a la que existe entre los grupos, y por consiguiente no se distinguen efectos claros de sitio o tratamiento que separen a las muestras.

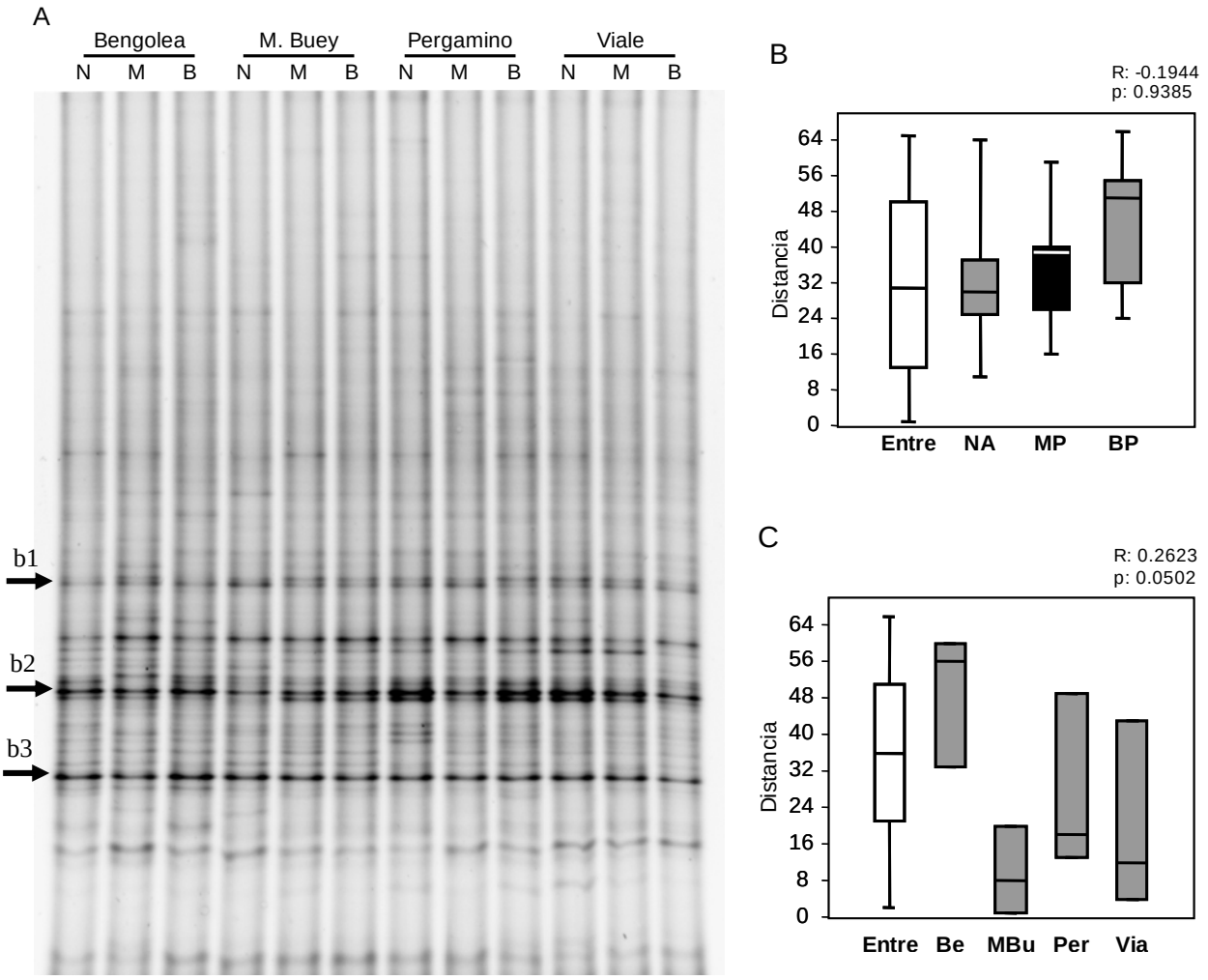

Fig. 4.19: (A) DGGE de Alfaproteobacteria para el muestreo 4. N: Ambiente Natural, M: Malas Prácticas y B: Buenas Prácticas. (B y C) Box plot-ANOSIM comparando tratamientos y sitios respectivamente. Los valores de R y p corresponden a la comparación entre tratamientos (B) y entre sitios (C). Diferencias significativas con valores de p<0.05.

La secuenciación de las bandas más intensas tomadas del gel indicaron que pertenecen al orden de los Rhizobiales (flechas b1 y b3) y a la familia Sphingomonadaceae (b2).

Betaproteobacteria

Las bacterias pertenecientes a esta clase son muy estudiadas en suelos debido a que incluyen al grupo de Burkholderias, las cuales pueden encontrarse asociadas con raíces de plantas y son capaces de fijar nitrógeno, estimular el crecimiento vegetal, producir antibióticos y degradar

distintos compuestos. También son conocidas como importantes patógenos en plantas (Coenye 2003, Salles 2004). Otro grupo son los oxidantes de amonio, los cuales cumplen una función clave en el proceso de nitrificación. En suelos hasta el momento se sabe que los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosospira* de este grupo intervienen en el proceso. En el análisis de las secuencias obtenidas en este trabajo se encontró que más del 45% corresponden al orden de las Burkholderiales, principalmente a los géneros *Burkholderia*, *Variovorax y Massilia*. Entre los géneros de nitrificantes, se encontró que cada uno representa solamente el 1% del total de Betaproteobacterias. Del resto de secuencias pertenecientes a la clase, aproximadamente el 50% no pudo ser clasificada con un rango de confianza mayor al 80%.

Las curvas de acumulación para el índice de Shannon muestran que este grupo no alcanzó un valor constante por debajo de las 1.000 secuencias para ninguna de las muestras. Sin embargo pueden compararse para cada sitio los valores de diversidad, y no se observan patrones que correlacionen con los tratamientos. En general la diversidad es mayor en las muestras de Bengolea, pero sin haber diferencias entre los tres ambientes (Fig. 4.20).

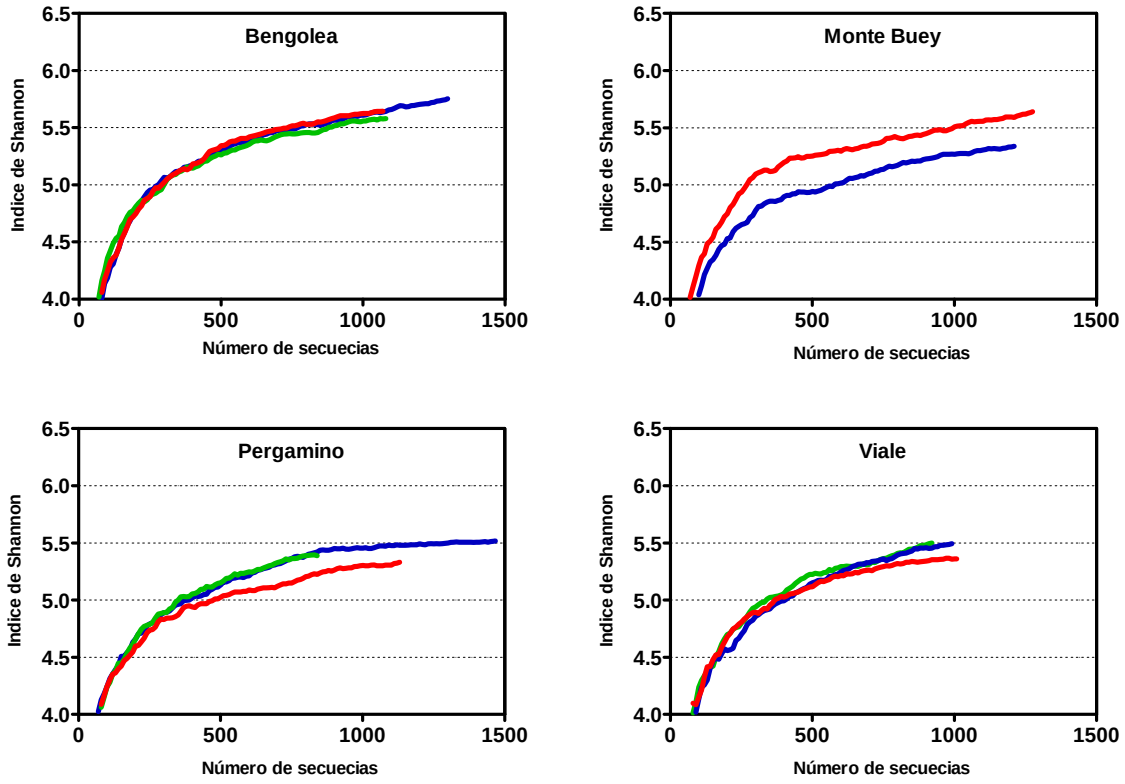

Fig. 4.20: Curvas de acumulación para los valores del Índice de Shannon para la clase Betaproteobacteria calculados en base a secuencias únicas. Verde: Natural, rojo: Malas Prácticas y azul: Buenas Prácticas.

En cuanto a los resultados de qPCR para los cuatro muestreos se encontró que no había diferencias significativas por sitios y tratamientos, pero sí se encontraron diferencias entre las estaciones (p=0,0001) e interacción sitio-estación (p<0,0001) (Fig. 4.21). Los contrastes realizados indicaron que las diferencias significativas entre estaciones se dan para los sitios de Bengolea, Pergamino y Viale. Otro dato que surge de los valores de cuantificación es que parece tratarse de un grupo muy variable en el tiempo, y como se ve en el grafico las cantidades relativas en las distintas muestras cambian en los distintos muestreos.

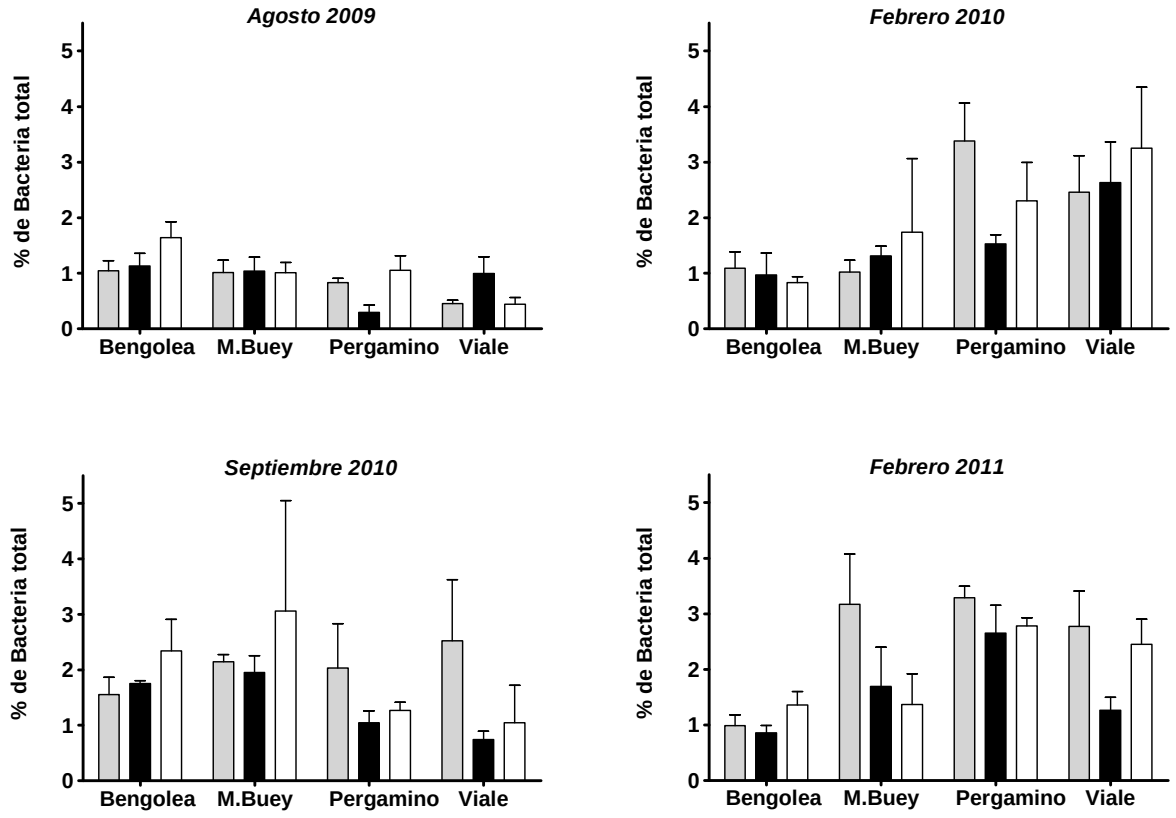

Fig. 4.21: Cuantificación por qPCR del numero de copias del gen ARNr 16S de la clase Betaproteobacteria expresados como porcentaje del total de bacterias. Gris: Ambiente Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

En los geles de DGGE para cada tratamiento por separado donde se comparan los sitios, agrupando las muestras por tiempos, existen diferencias entre las distintas localidades La

similitud de los perfiles a distintos tiempos parece ser mayor para las muestras del ambiente natural (Fig. 4.22-A). Para los dos manejos agrícolas, las diferencias entre sitios no son marcadas. Sin embargo, los análisis de ANOSIM indican que para los tres tratamientos existen diferencias significativas por sitios. Y en todos los casos las diferencias dentro de las muestras de Monte Buey y Pergamino resultan menores (Fig. 4.22-B).

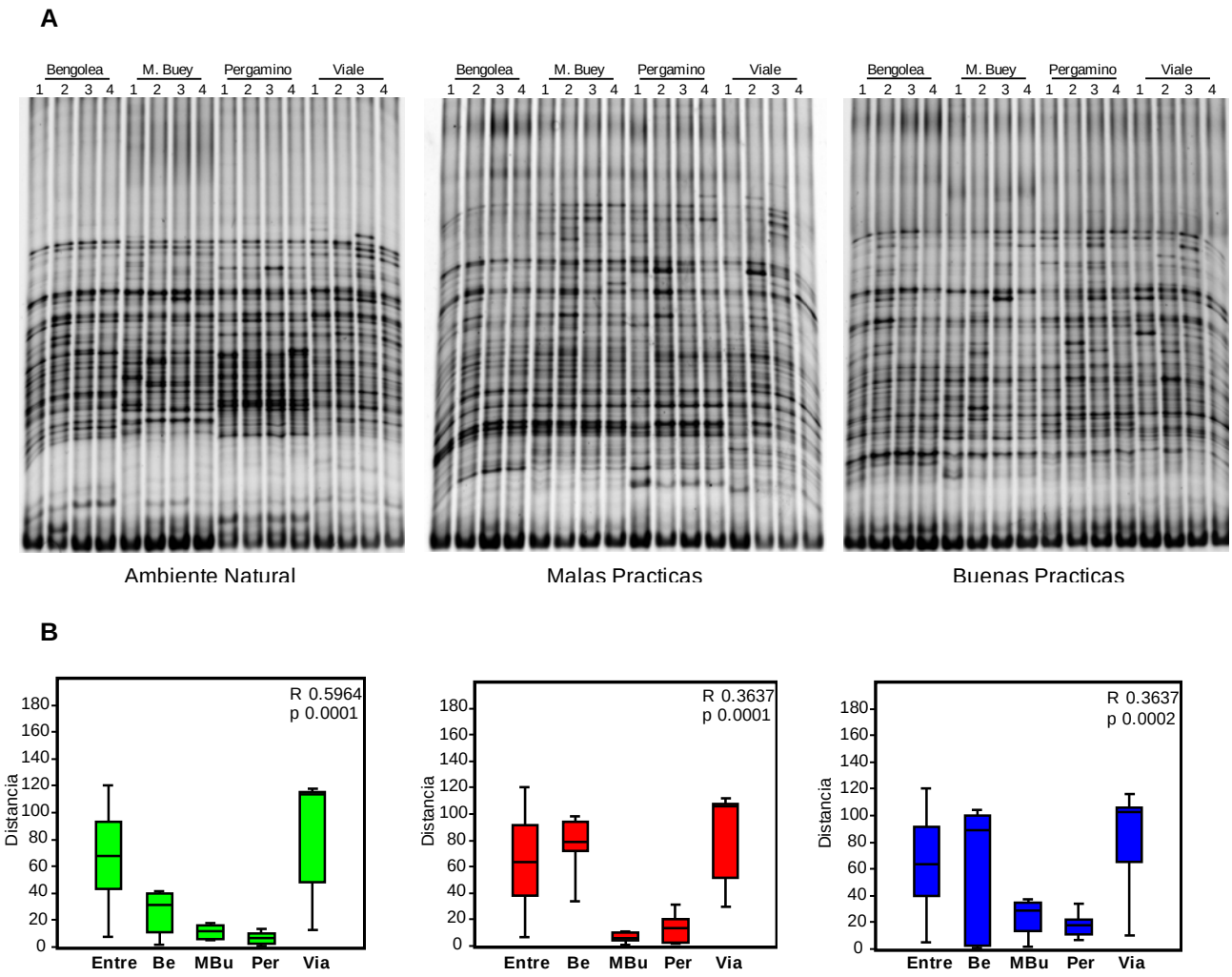

Fig. 4.22: (A) DGGE de Betaproteobacteria separados por tratamientos. Para cada sitio se muestran los tiempos correspondientes a los cuatro muestreos (1 a 4). (B) Box plot-ANOSIM de los DGGE para cada tratamiento. Los valores de R y p en los análisis corresponden a la comparación entre sitios. Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

En el análisis mediante DGGE de las muestras de Febrero de 2011 se encontró un gran número de bandas, sin un patrón particular que pueda ser relacionado con efectos de tratamiento. De los

análisis de similitud entre muestras surge que no existen diferencias significativas agrupando por tratamientos (Fig. 4.23-B) ni tampoco por sitios (Fig. 4.23-C).

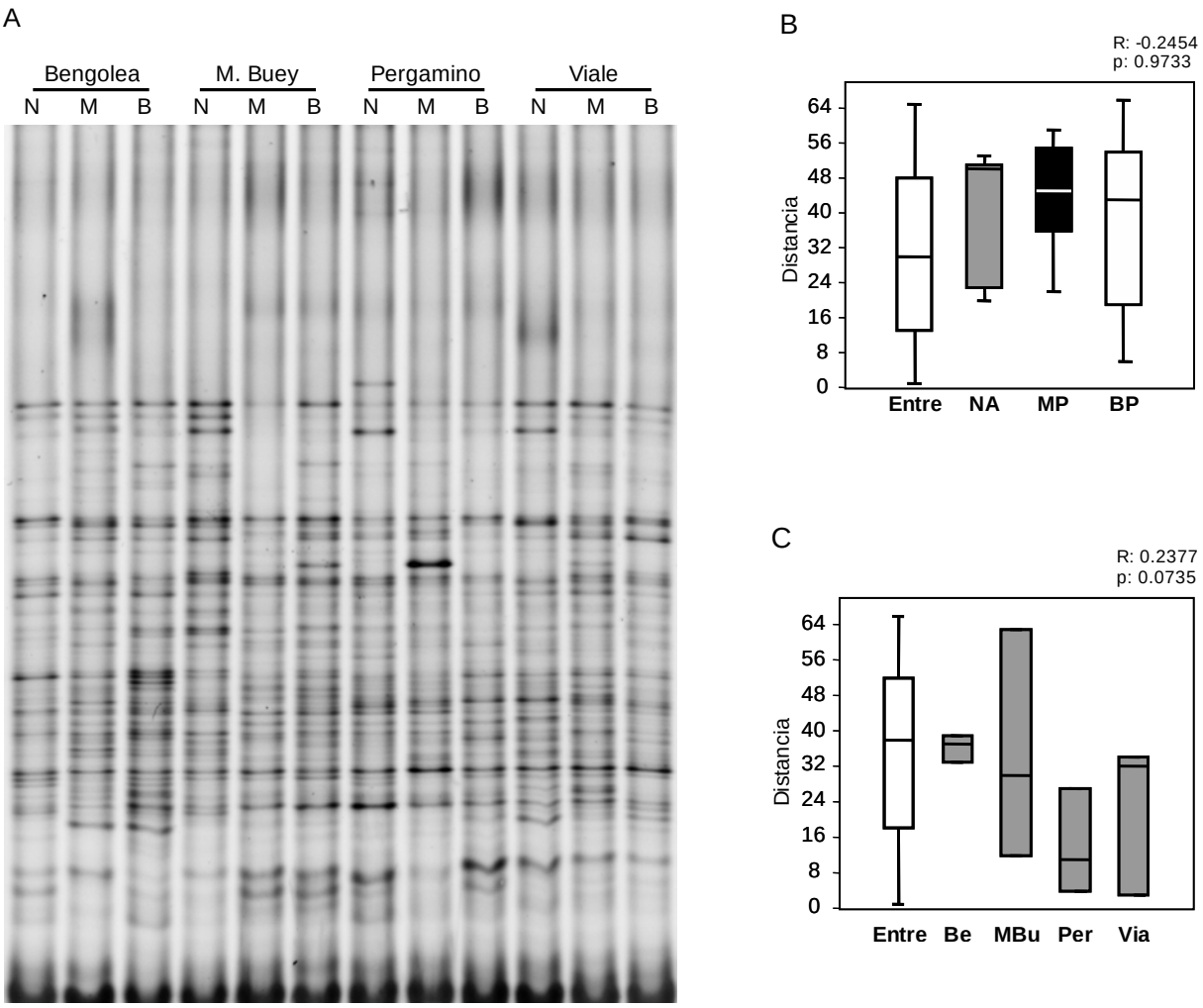

Fig. 4.23: (A) DGGE de Betaproteobacteria para el muestreo 4. N: Ambiente Natural, M: Malas Prácticas y B: Buenas Prácticas. (B y C)Box plot- ANOSIM comparando tratamientos y sitios respectivamente. Los valores de R y p corresponden a la comparación entre tratamientos (B) y entre sitios (C). Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

Esto sugiere que hay grandes diferencias entre sitios y que las bacterias de este grupo no parecen responder a las características generales de cada sitio y en mucho menor medida a los tratamientos.

Este taxón parece ser un grupo muy variable en el tiempo. Si bien la similitud en el perfil de bandas a lo largo del tiempo para una misma muestra se mantiene más o menos estable, muchas de las bandas varían considerablemente su intensidad, o en algunos casos aparecen y desaparecen, mostrando a este grupo como uno de los más dinámicos.

Firmicutes

Este es otro de los filos que suelen ser más abundantes en suelos. Dos de los géneros principales dentro de este taxón son *Bacillus* y *Clostridium*. Su actividad en suelos se ha relacionado principalmente con procesos de degradación de materia orgánica y compuestos como la celulosa (Desvaux 2005, Lynd 2002) y la lignina (DeAngelis 2011).

En los análisis a partir de los datos de secuencias del muestreo de Agosto de 2009 se encontró que la mayoría de las bacterias de este grupo pertenecen al orden Bacillales, principalmente al género *Bacillus*. Los valores calculados mediante curvas de acumulación para el índice de diversidad de Shannon alcanzan rápidamente un valor constante y más o menos similar en todos los casos. Este resultado sugiere que no existen efectos tanto de los sitios como de los manejos que afecten significativamente la diversidad de las poblaciones de Firmicutes (Fig. 4.24).

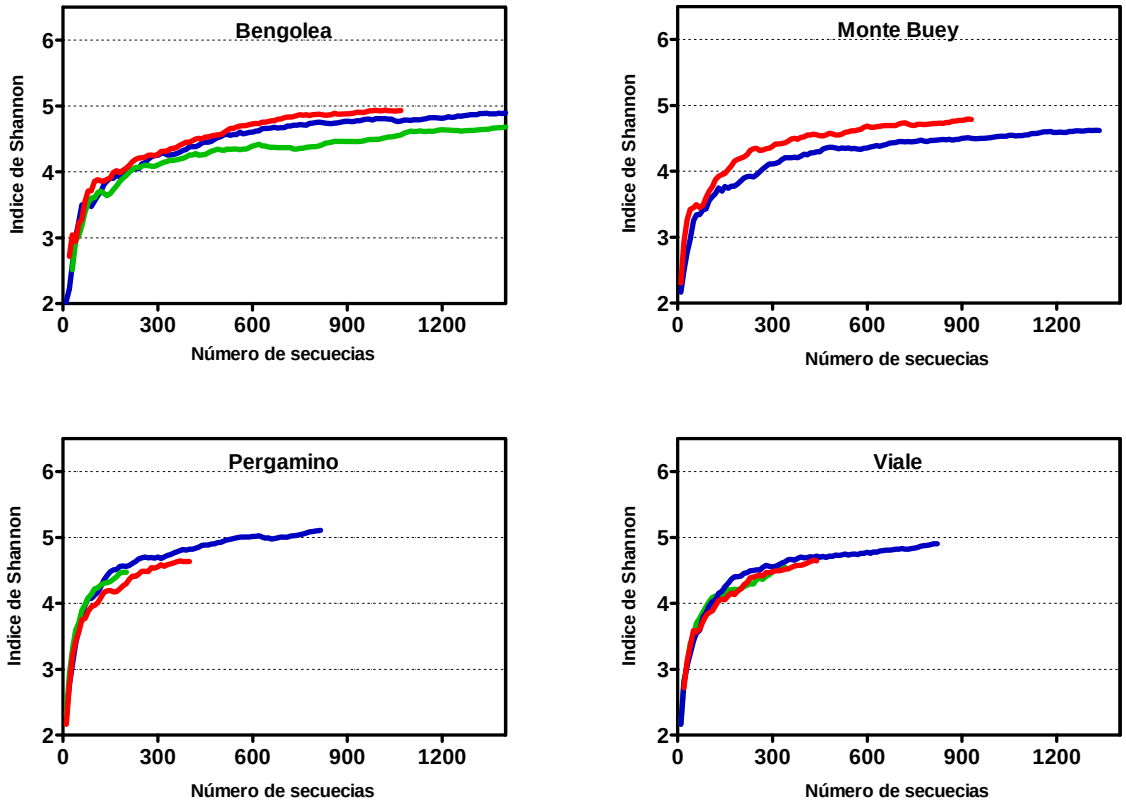

Fig. 4.24: Curvas de acumulación para los valores del Índice de Shannon para el filo Firmicutes calculados en base a secuencias únicas. Verde: Natural, rojo: Malas Prácticas y azul: Buenas Prácticas.

Los experimentos de qPCR mostraron gran variabilidad en la abundancia de este taxón entre los distintos muestreos. En función de los resultados, no es extraño observar que no se encontraron

diferencias significativas por sitios, ni tratamientos. Sin embargo los datos arrojaron diferencias entre las temporadas de invierno y verano (p=0,0004) (Fig. 4.25).

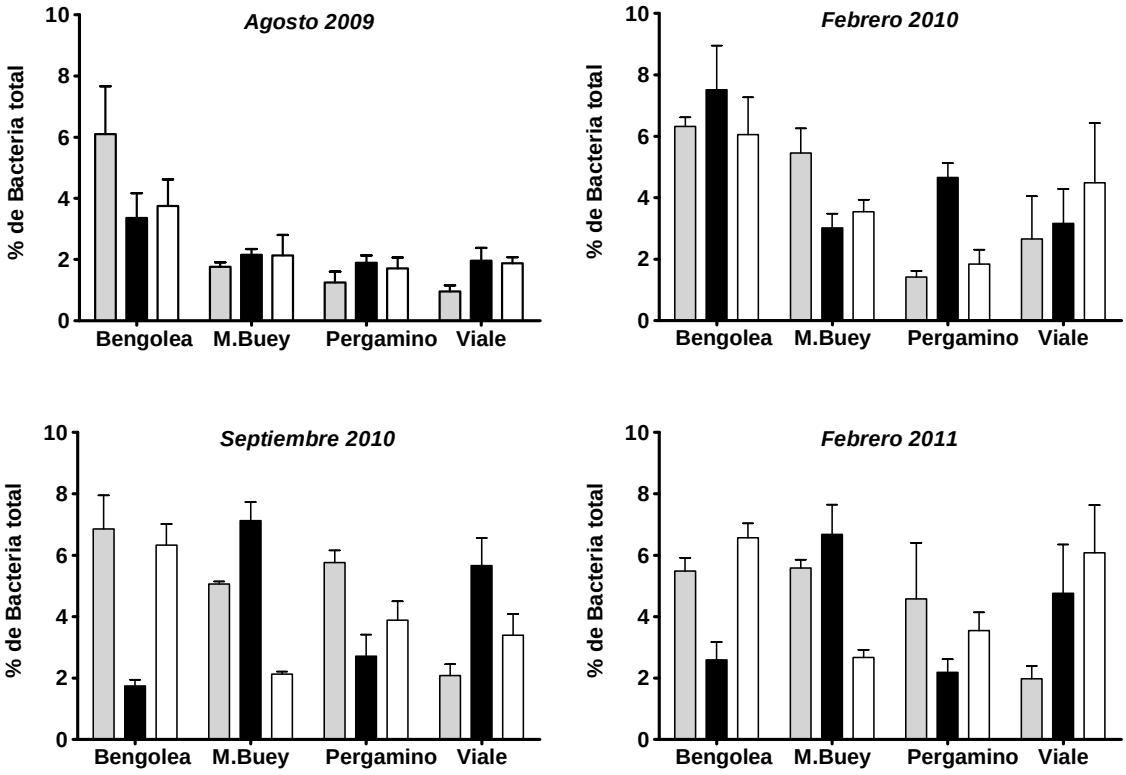

Fig. 4.25: Cuantificación por qPCR del numero de copias del gen ARNr 16S del filo Firmicutes expresados como porcentaje del total de bacterias. Gris: Ambiente Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

Cuando se compararon las muestras de Febrero 2011 mediante DGGE pudo verse que el patrón de bandas obtenido era similar en todas las muestras, con algunas bandas comunes a todos los sitios y tratamientos. También se distingue un patrón característico que diferencia a las muestras según la ubicación geográfica. Estas diferencias se hacen evidentes en los análisis de ANOSIM donde las muestras agrupadas por sitios mostraron diferencias significativas (p=0,0001) (Fig. 4.26-C), mientras que en el agrupamiento por tratamientos no hubo diferencias (Fig. 4.26-B). En este análisis los valores de distancia entre las MP de los cuatro sitios resultaron menores que para los otros tratamientos, aunque pruebas a *post-hoc* entre pares de grupos no mostraron valores significativamente diferentes entre los grupos.

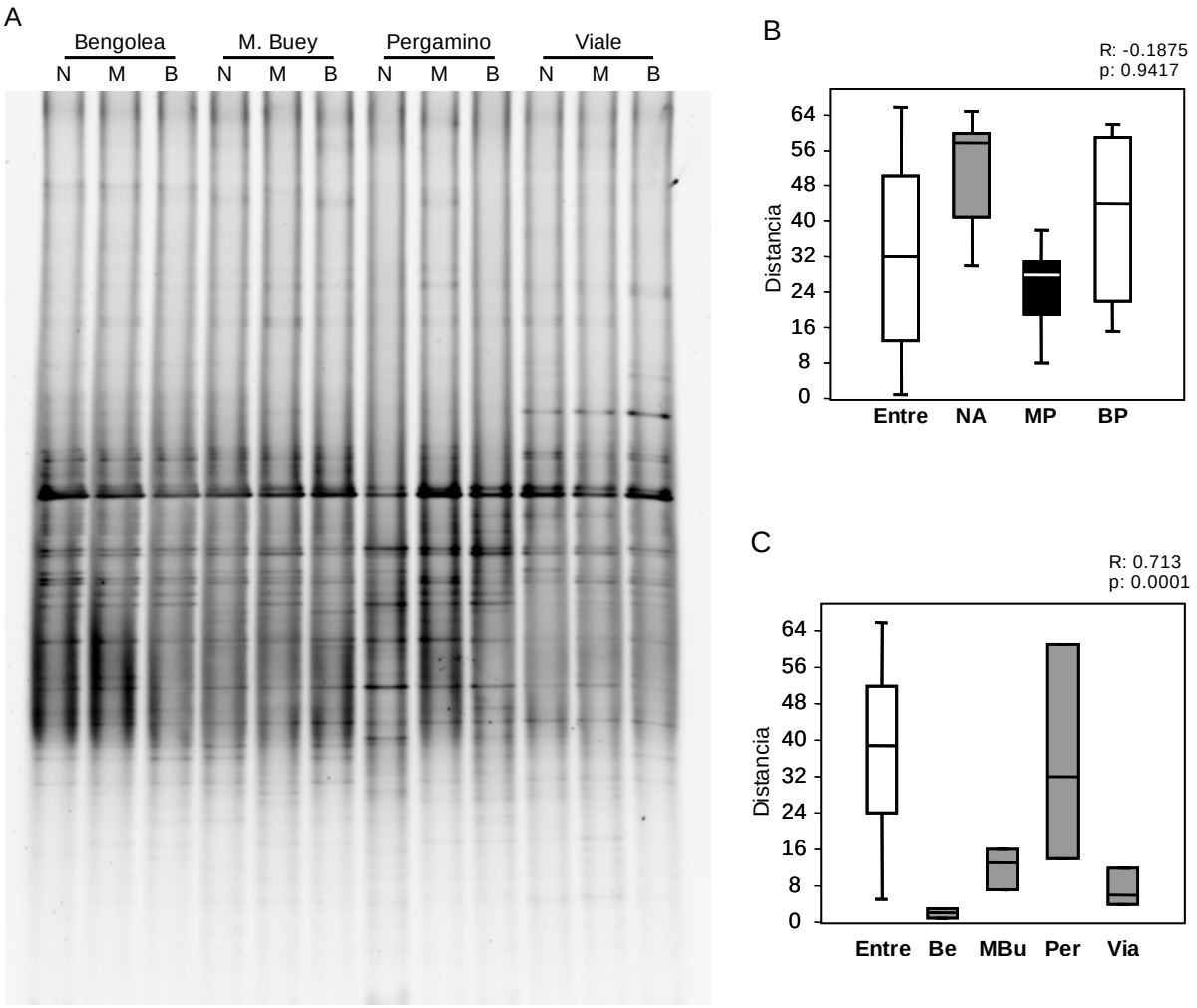

Fig. 4.26: (A) DGGE de Firmicutes para el muestreo 4. N: Ambiente Natural, M: Malas Prácticas y B: Buenas Prácticas. (B y C)Box plot- ANOSIM comparando tratamientos y sitios respectivamente. Los valores de R y p corresponden a la comparación entre tratamientos (B) y entre sitios (C). Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

Gammaproteobacteria

Uno de los grupos particularmente interesantes en suelos son las Gammaproteobacterias. A este grupo pertenecen géneros como *Nitrosococcus* (Purkhold 2000, Koops 2003), uno de los grupos conocidos de oxidantes de amonio, y géneros como *Stenotrophomonas*, y *Pseudomonas*, frecuentemente aislados de suelos y conocidos por su diversidad metabólica y capacidad para degradar distintos compuestos orgánicos.

A pesar de que no se vio que sea un grupo abundante en las muestras analizadas por pirosecuenciación y que no se conocen oligonucleótidos efectivos para realizar experimentos de

qPCR sobre este grupo, se decidió analizar los datos disponibles de pirosecuenciación y posteriormente ampliar el estudio a grupos internos de este taxón.

Los valores de diversidad no mostraron diferencias considerables entre tratamientos, salvo para la localidad de Viale donde las MP poseen un valor del índice menor al resto (Fig. 4.27).

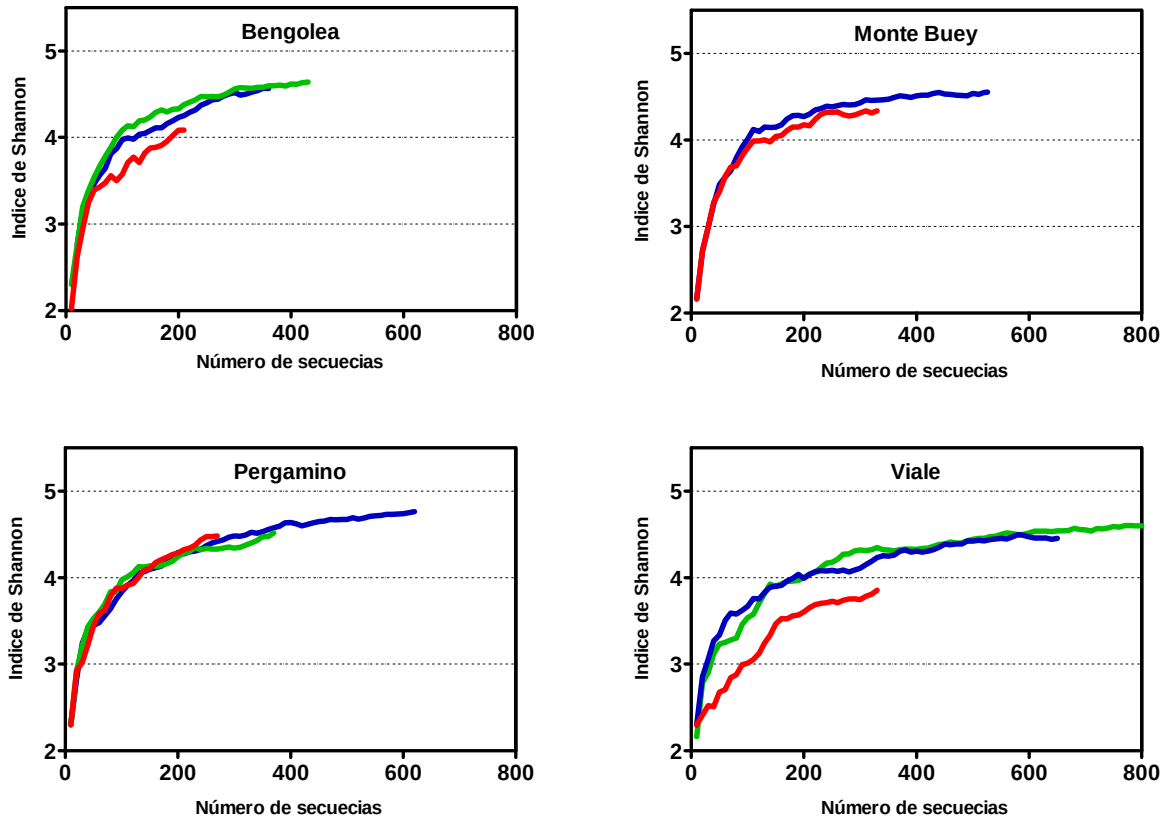

Fig. 4.27: Curvas de acumulación para los valores del Índice de Shannon para la clase Gammaproteobacteria calculados en base a secuencias únicas. Verde: Natural, rojo: Malas Prácticas y azul: Buenas Prácticas.

De los grupos que componen este taxón los que se resultaron mayoritarios en las muestras analizadas corresponden al orden Xanthomonadales (entre 43% y 62%), principalmente a las familias Xanthomonadaceae y Sinobacteraceae, y en mucho menor medida a los órdenes Pseudomonadales y Legionellales. Además, con un gran porcentaje de Gammaproteobacterias no clasificadas de entre 25% y 50%.

Debido a que el grupo mayoritario corresponde a la familia Xanthomonadaceae, y que es en este grupo donde se dan las diferencias entre tratamientos que se reflejan en el total de la clase, se

decidió diseñar y sintetizar oligonucleótidos específicos para esta familia, para posteriormente ser utilizados en experimentos de DGGE y qPCR. Se obtuvo un oligonucleótido (denominado Xan878F) que en combinación con otros cebadores universales para el dominio bacteria permitió llevar a cabo los experimentos.

Para determinar si las diferencias en el número de secuencias de la familia Xanthomonadaceae entre las muestras eran significativas se llevó a cabo la cuantificación mediante qPCR en todas las muestras. Los resultados mostraron que existían diferencias significativas tanto entre sitios ($p=0,001$) como entre tratamientos ($p<0,0001$) (Fig. 4.28). Los análisis de comparaciones de las medias mostraron que las diferencias fueron significativas entre los tres tratamientos.

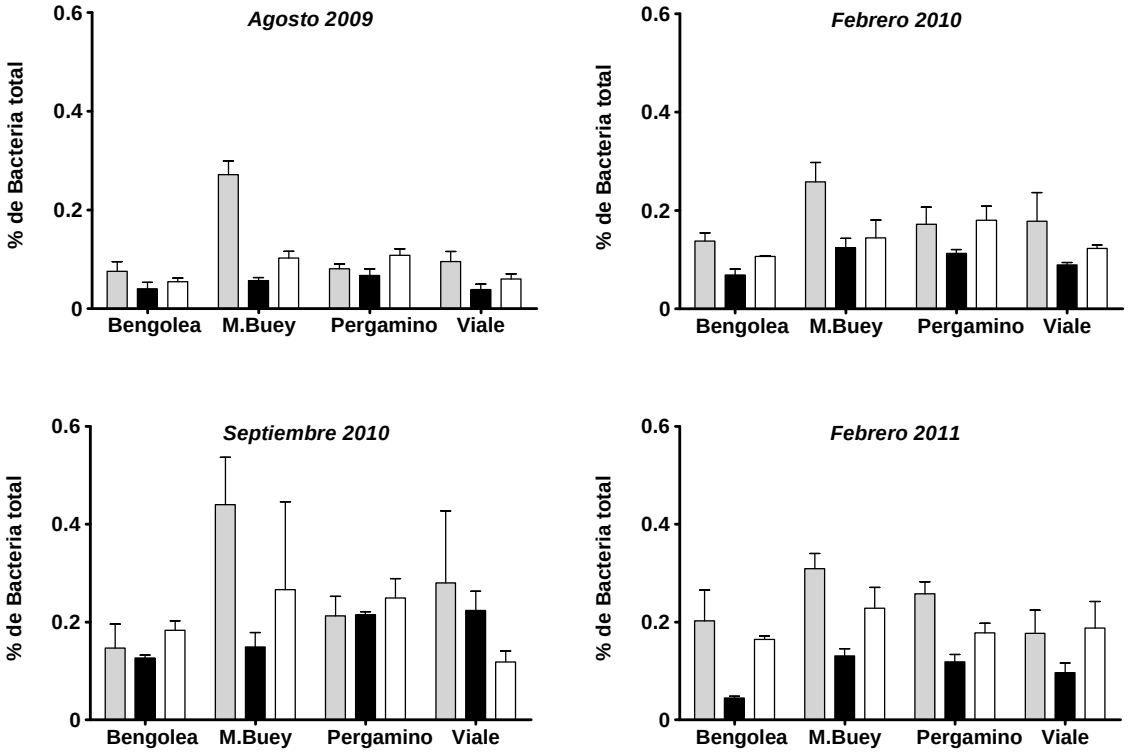

Fig. 4.28: Cuantificación por qPCR del numero de copias del gen ARNr 16S de la familia Xanthomonadaceae expresados como porcentaje del total de bacterias. Los colores corresponden a los distintos tratamientos: Gris: Ambiente Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

Por otro lado utilizando las secuencias de la pirosecuenciación se construyó un árbol filogenético para determinar la manera en la que se agrupan estas secuencias (Fig. 4.29). Para el árbol solo se

utilizaron las secuencias amplificadas a partir del oligonucleótido 27F, en primer lugar para disminuir la cantidad de secuencias comparadas en aproximadamente el 50%, y en segundo lugar para utilizar la parte anterior del gen de ARNr 16S donde se encuentran las regiones variables V1 y V2 del gen del ARNr 16S (Baker 2003).

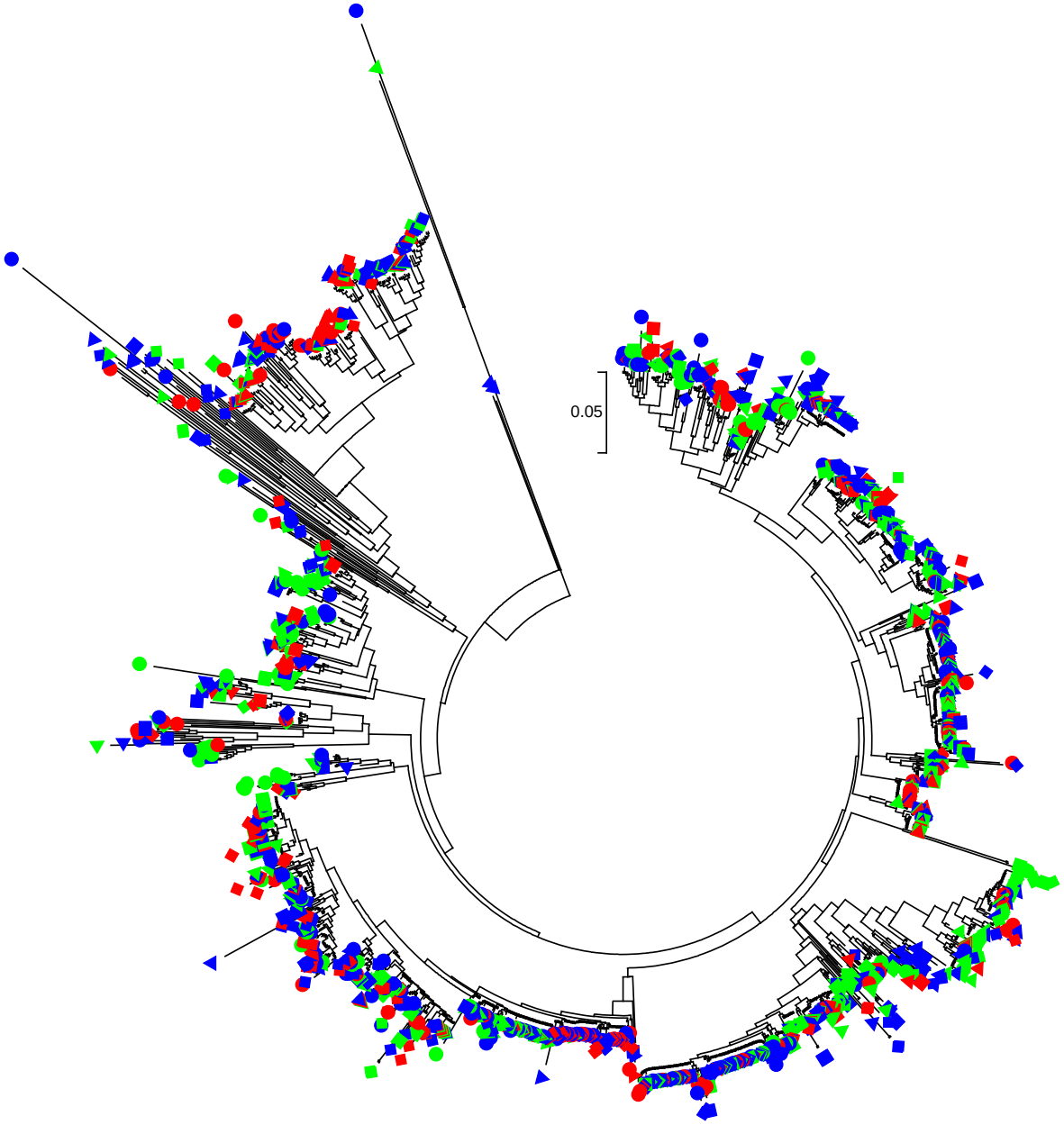

Fig. 4.29: Árbol de las secuencias de la pirosecuenciación clasificadas como Xanthomonadaceae. Solo se utilizaron las secuencias amplificadas con el cebador 27F para reducir el número de secuencias en el árbol y conservar las regiones variables al principio del gen. Las secuencias con menos de 450 pb fueron eliminadas. Verde: Natural, rojo: Malas Prácticas y azul: Buenas Prácticas. Círculos: Monte Buey, cuadrados: Bengolea, triángulos: Viale y rombos: Pergamino.

En el grafico se observa que no se forman grupos definidos para ninguno de los tratamientos ni sitios y que todas las secuencias se distribuyen sin un patrón por todo el árbol, independientemente de la muestra de la que provienen. Esto sugiere que las diferencias en cantidad de secuencias entre las muestras no se deben a un único grupo monofilético definido, si no más bien a diferencias en la cantidad total de todas las bacterias de esta familia entre las muestras de BP y MP.

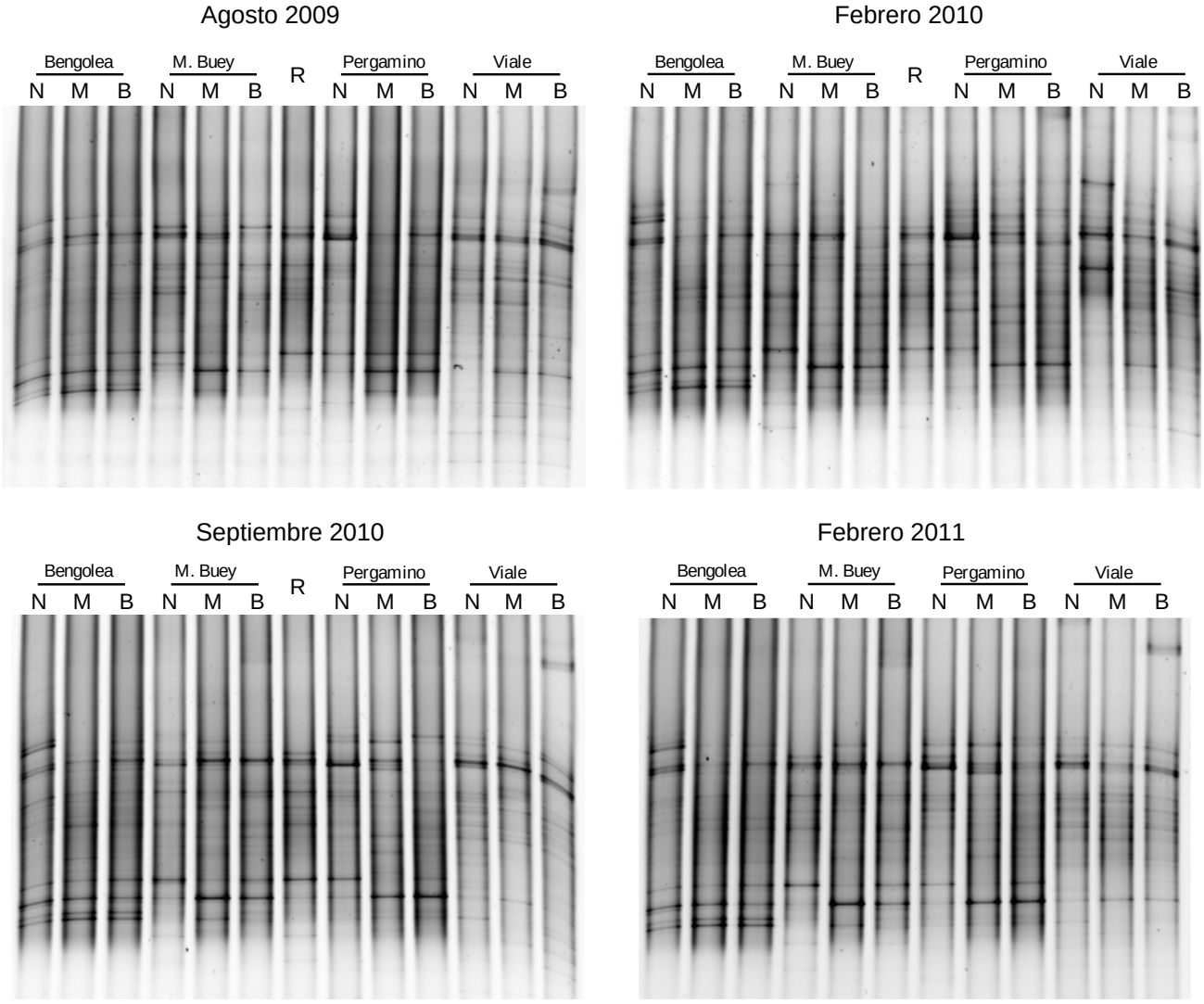

Fig. 4.30: DGGE de Xanthomonadacea. Cada uno de los geles corresponde a un muestreo. Utilizando una calle repetida como referencia en todos los geles (R) se pudieron alinear perfectamente todas las muestras en un mismo análisis y generar una sola matriz de datos. N: Ambiente natural, M: Malas Prácticas, B: Buenas Prácticas. R: Corresponde a la muestra N de Monte Buey de Febrero de 2011utilizada como calle de referencia.

Para ver si la composición de la comunidad cambiaba con el transcurso del tiempo, se analizaron mediante DGGE los perfiles de todas las muestras. Las características particulares de este experimento de DGGE donde el tamaño del fragmento en de 400pb y no 200 pb como en los casos anteriores, sumado al hecho de que se trata de un grupo filogenéticamente mas reducido, y por lo tanto la cantidad de bandas es menor y su posición mas definida, permitió generar una matriz con los datos de todas las muestras juntas a partir de cuatro geles (Fig. 4.30).

Al comparar las muestras de los distintos tiempos para cada combinación de sitio y tratamiento se encontró que existían diferencias significativas entre los sitios, mientras que los valores de similitud entre tiempos se mantuvieron bajos, sugiriendo poco cambio entre los distintos muestreos. El único valor que se mostró más alto que la media entre grupos corresponde a las MP de Viale, y los valores más bajos, es decir las muestras más similares corresponden a la localidad de Bengolea para los tres tratamientos (Fig. 4.31).

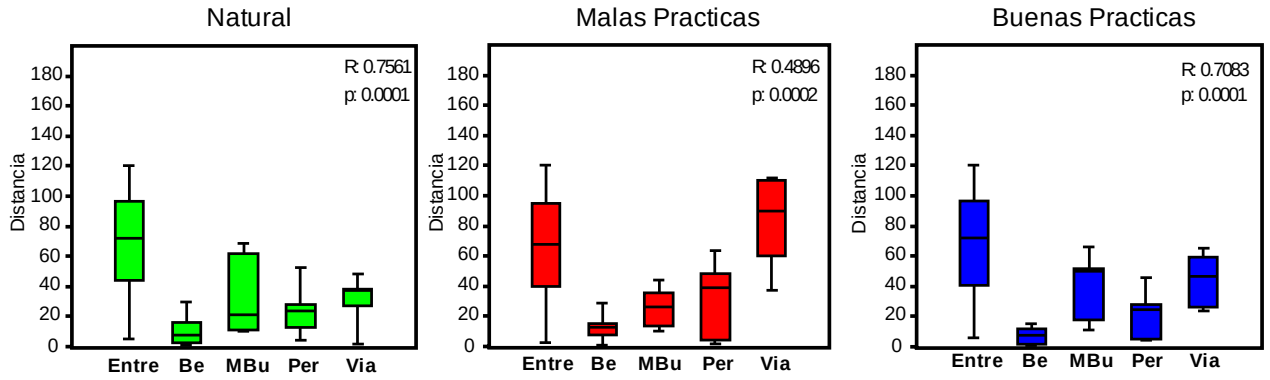

Fig. 4.31: Box plot-ANOSIM de las muestras de DGGE de la familia Xanthomonadaceae separadas por tratamiento. Los valores de R y p en los análisis corresponden a la comparación entre sitios. Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

Al separar las muestras por tiempos, realizamos análisis independientes por muestreo y comparamos los grupos formados por los distintos tratamientos y sitios. En el primer caso para los cuatro ANOSIM donde las muestras están agrupadas según los tres tratamientos, no presentaron diferencias significativas en ninguno de los casos por lo que indica que no habría un patrón común de bandas característico para ninguno de los tratamientos (Fig. 4.32).

En el caso de los resultados de la figura 4.33 correspondientes a las diferencias entres sitios, al agrupar los tres tratamientos se observaron valores significativos de *p* que indican diferencias

entre los sitios para cada uno de los muestreos. Indicando que las diferencias en el perfil de estas comunidades está determinado mayormente por las diferencias geográficas. En estos análisis nuevamente puede verse que Bengolea es la localidad donde existe menor variación.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de este grupo sugieren que las poblaciones de bacterias de la familia Xanthomonadaceae en las distintas muestras no solo se encuentran influenciadas por las características propias de cada suelo, según su lugar geográfico, sino que a pesar de no mostrar diferencias en su composición, responden cuantitativamente a variables asociadas a los distintos manejos agrícolas, y lo hacen de forma sostenida en el tiempo. Estas características podrían sugerir a este grupo como un posible indicador de tratamientos.

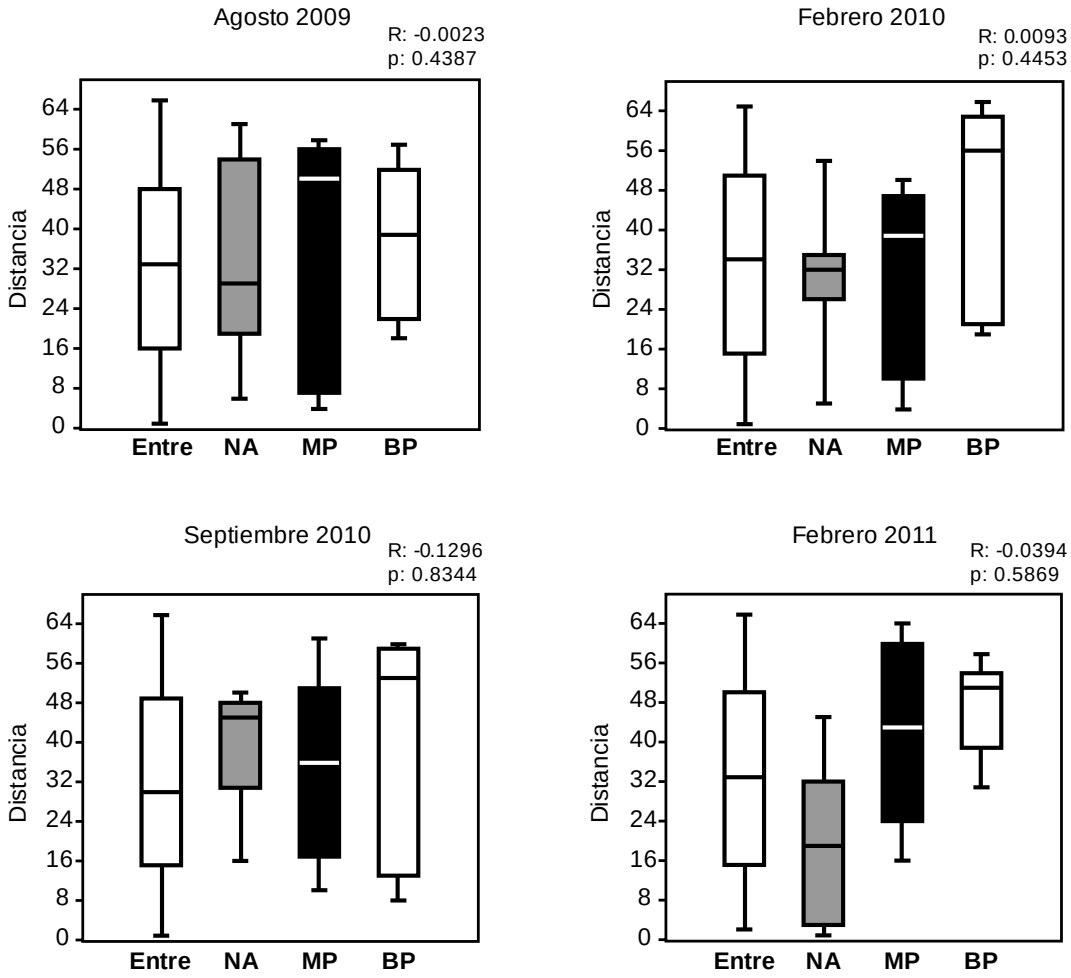

Fig. 4.32: Box plot-ANOSIM de las muestras de DGGE de la familia Xanthomonadaceae comparando los tratamientos para cada uno de los muestreos. Los valores de R y p corresponden a la comparación entre tratamientos. Diferencias significativas con valores de $p<0.05$.

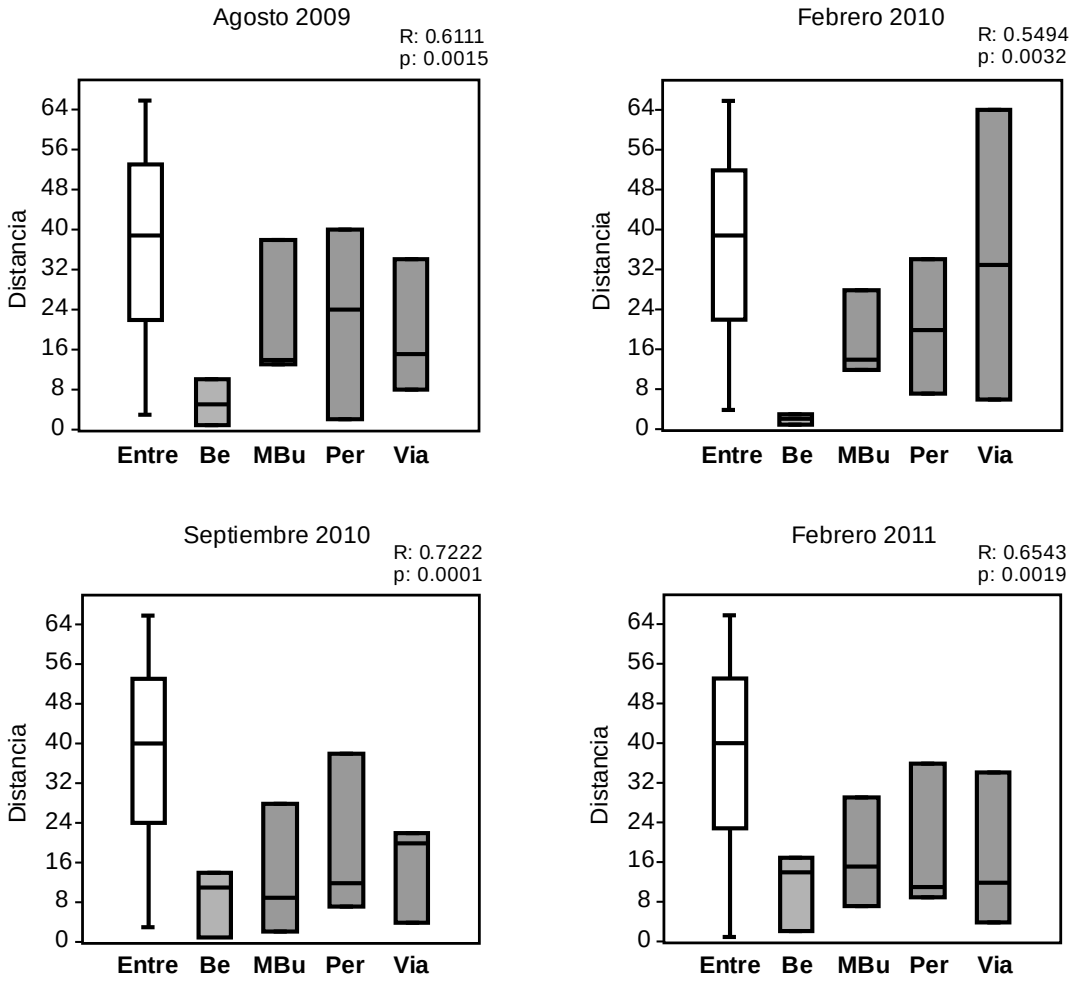

Fig. 4.33: Box plot-ANOSIM de las muestras de DGGE de la familia Xanthomonadaceae comparando los sitios para cada uno de los muestreos. Los valores de R y p corresponden a la comparación entre tratamientos. Diferencias significativas con valores de p<0.05.

Indicadores de Tratamiento

Los análisis de los datos de pirosecuenciación también nos sirvieron para identificar posibles grupos taxonómicos que pueden tener relevancia desde el punto de vista funcional en las comunidades y por esto servir como indicadores biológicos de los distintos tipos de manejo. La utilización de test estadísticos diseñados para detectar grupos indicadores (IndVal), aplicados sobre los datos de pirosecuenciación, mostraron que determinados grupos de bacterias (OTUs agrupados con valores de similitud al 95%) presentaban diferencias significativas entre los tratamientos MP y BP (Tabla 4.4).

Trat.	IndVal	Frecuencia	p	q	tamaño	Filogenia
BP	0,86	8	0,028	0,041	100	Acidobacteria/Acidobacteria Gp1
MP	0,78	9	0,032	0,041	76	Proteobacteria/Alfaproteobacteria/*Rubellimicrobium*
BP	0,91	7	0,050	0,041	55	Proteobacteria/Alfaproteobacteria
MP	0,85	8	0,037	0,041	34	Actinobacteria/Actinomycetales/Micromonosporaceae
MP	0,75	8	0,043	0,041	28	Acidobacteria/Acidobacteria Gp16
BP	0,85	7	0,014	0,041	26	No clasificada
BP	0,83	6	0,044	0,041	23	No clasificada
MP	1,00	4	0,009	0,041	20	No clasificada
MP	0,80	7	0,038	0,041	20	Actinobacteria/ctinobacteria/Actinomycetales

Tabla 4.4: Resultado del análisis de búsqueda de grupos indicadores (IndVal). Trat.: Tratamientos. Frecuencia: Número de muestras en las que fue encontrado el grupo. p: Valores de signifcancia del índice menores a 0,05. q: Valores de la probabilidad de reportar un falso positivo menores a 0,05. Tamaño: Número de secuencias que componen el grupo. La clasificación filogenética corresponde a valores de bootstrap ≥ 80%.

Ordenando los datos según el tamaño de los grupos encontrados, los mejores indicadores serían un grupo de la clase Acidobacteria Gp1 (Indicador de BP), y el género *Rubellimicrobium* (Indicador de MP).

Debido a que estos resultados están basados en la información de la pirosecuenciación que no es estrictamente cuantitativa y solo provienen del primer muestreo, era necesario corroborar estos datos cuantitativamente para todos los muestreos. Para tal fin se diseñaron cebadores específicos para ambos grupos y se utilizaron en ensayos de qPCR.

Acidobacteria Gp1

Para el grupo de Acidobacteria Gp1 los datos de pirosecuenciación mostraban grandes diferencias entre la cantidad de secuencias de Buenas y Malas prácticas en tres de los cuatro sitios (en Viale la diferencia no fue significativa).

Este grupo consta de 100 secuencias que surgen del agrupamiento en OTUs con un valor de similitud del 95%. Las secuencias de este grupo pertenecen en su mayoría a los tratamientos de

BP, y por consiguiente sugieren que estos organismos serian susceptibles a ciertas condiciones relacionadas con el tipo de manejo agrícola.

Para realizar los ensayos de qPCR, se diseñaron nuevos oligonucleótidos para unirse y amplificar selectivamente solo las secuencias del grupo de interés. Los análisis sobre las bases de datos de secuencias del gen ARNr 16S indicaron que estos cebadores solo pueden aparearse con 19 secuencias de las disponibles, de las cuales 16 corresponden al grupo Acidobacteria Gp1. Estas secuencias tienen gran similitud con las pertenecientes al grupo detectado como indicador y agrupan juntas como un grupo monofilético dentro de Acidobacteria Gp1 (Fig. 4.34).

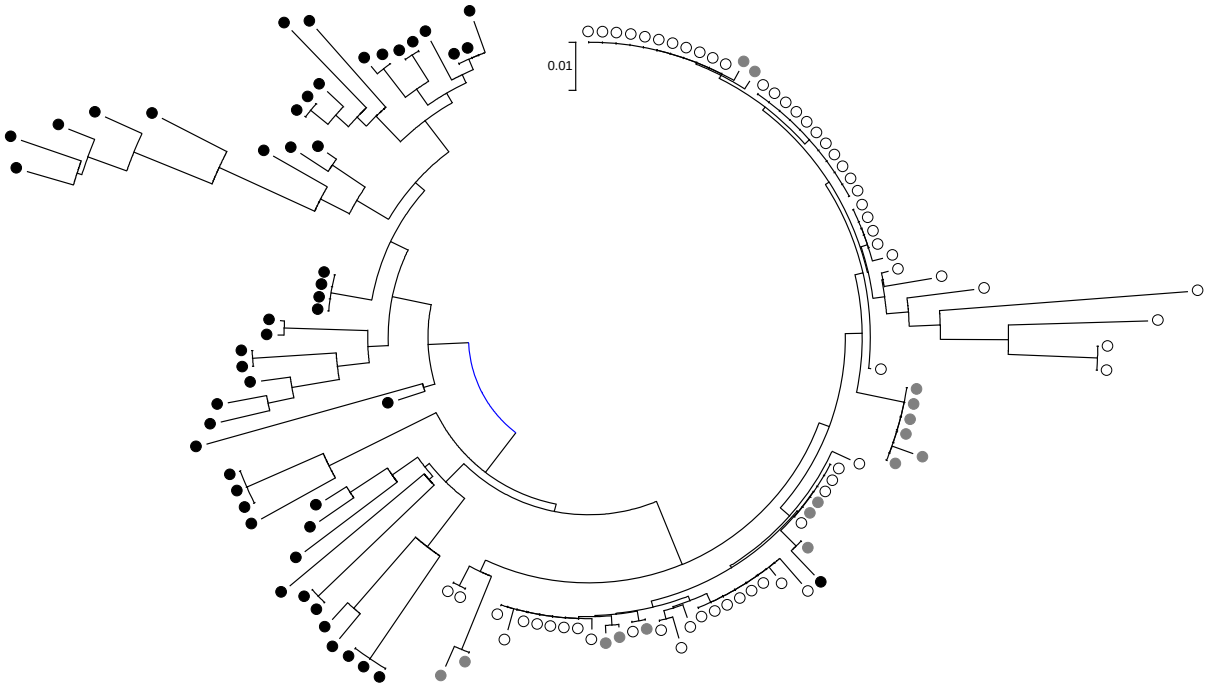

Fig. 4.34: Árbol filogenético de secuencias del grupo Acidobacteria Gp1. En color negro se muestran secuencias representativas de la clase Gp1 de Acidobacteria tomadas de RDP. En blanco están representadas las secuencias de la pirosecuenciación correspondientes al OTU detectado como posible indicador. Mientras que en gris se indican las secuencias provenientes de la base de datos de RDP que según los análisis in silico pueden ser amplificadas utilizando los oligonucleótidos diseñados para el OTU indicador. Para la construcción del árbol las secuencias con menos de 450 pb no fueron utilizadas.

Utilizando estos cebadores se encontró que las diferencias fueron significativas por tratamiento ($p<0,0001$), sitio ($p<0,0001$) e interacción entre sitio y tratamiento ($p<0,0001$) (Fig. 4.35).

Debido a la presencia del efecto de interacción se realizó una prueba de contrastes entre los tres manejos para cada sitio. Este análisis mostró diferencias significativas entre los tratamientos de todos los sitios ($p<0,05$), con excepción de Pergamino entre NA vs MP, y en Viale entre NA vs BP y MP vs BP. Las muestras de Viale presentaban un muy bajo número de este grupo de Acidobacteria Gp1 y al igual que lo sugerían los datos de pirosecuenciación, las diferencias entre los tratamientos no fueron claramente distinguibles.

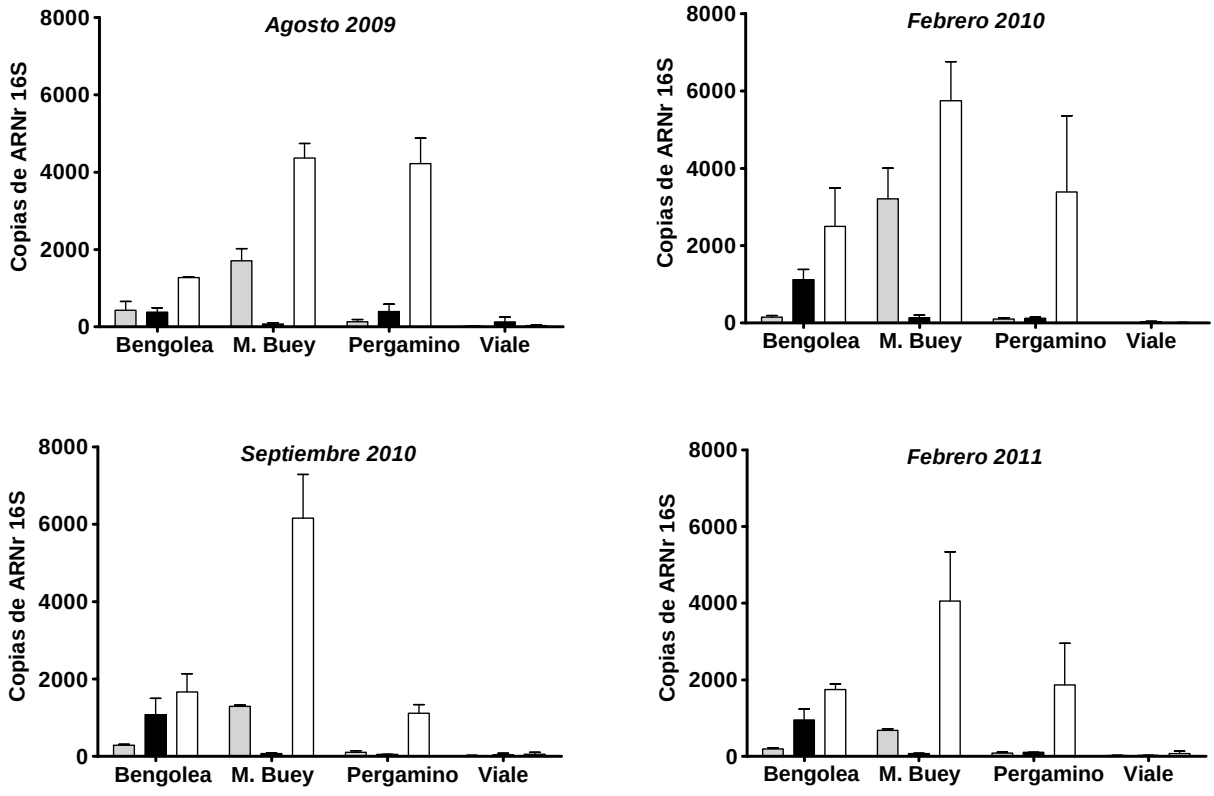

Fig. 4.35: Cuantificación por qPCR del número de copias del gen ARNr 16S del subgrupo de Acidobacteria Gp1. Los colores corresponden a los distintos tratamientos: Gris: Ambiente Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

Género Rubellimicrobium

Diseñamos cebadores específicos para este género de las alfaproteobacterias y los utilizamos para cuantificar su abundancia mediante qPCR. Se encontró que el número de copias en las muestras provenientes de las MP superaba en casi todos los casos a la cantidad detectada en las BP, confirmando lo observado mediante pirosecuenciación. Los análisis estadísticos de los datos

obtenidos mostraron diferencias significativas entre sitios (p=0,0327) y tratamientos (p<0,0001). (Fig. 4.36) Comparaciones a *posteriori* de las medias para los tratamientos dieron diferencias significativas entre NA, MP y BP (p<0,05). Al igual que lo encontrado para el grupo de Acidobacteria Gp1, este género parece responder de manera diferente a las condiciones presentes en los distintos sistemas de manejo agrícola, pero en este caso observando un aumento de la cantidad de bacterias en las MP.

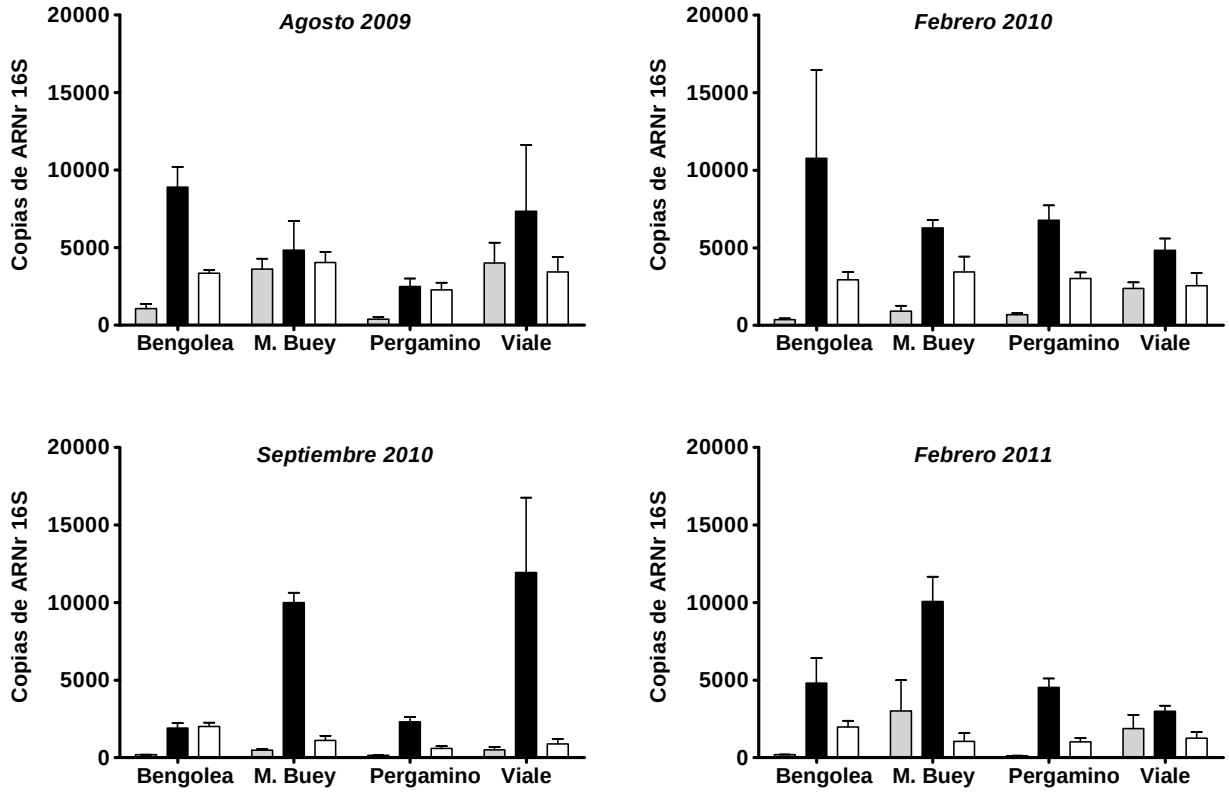

Fig. 4.36: Cuantificación por qPCR del número de copias del gen ARNr 16S de Rubellimicrobium. Los colores corresponden a los distintos tratamientos: Gris: Ambiente Natural, Negro: Malas Prácticas y Blanco: Buenas Prácticas.

Propuesta para un Índice Biológico de manejo agrícola

Aunque los resultados de los grupos mencionados anteriormente presentaron una clara correlación con las diferencias entre tratamientos, la variabilidad entre muestras no permite establecer valores absolutos que permiten diferenciar las MP de las BP. Precisamente, la utilidad principal de un indicador es poder establecer la calidad de un suelo independientemente de la

zona geográfica o fluctuaciones temporales que puedan darse. Por lo tanto, sugerimos en base a los resultados generados en este trabajo la implementación de un índice que permita determinar aquellos suelos que están sometidos a manejos deficientes, y cuales se encuentran en mejores condiciones productivas.

Para generar el índice proponemos utilizar datos cuantitativos obtenidos mediante qPCR de los grupos de Acidobacteria Gp1 y *Rubellimicrobium* que muestran respuesta a los efectos de tratamientos. Utilizando los valores provenientes de las muestras de campos agrícolas y un ambiente natural próximo como referencia de la abundancia de cada uno de los grupos en la zona, se calcula la relación entre ambos grupos y se aplica el logaritmo.
El cálculo del índice responde a la siguiente fórmula:

$$=\mathrm{Log}_{10}\ \frac{\dfrac{\text{Acidobacteria Gp1}}{\text{Natural Acidobacteria Gp1}}}{\dfrac{\textit{Rubellimicrobium}}{\text{Natural }\textit{Rubellimicrobium}}}$$

Como resultado se obtiene que en aquellos lugares donde la relación entre Acidobacteria Gp1 y *Rubellimicrobium* es alta, los valores del índice serán positivos, lo cual indica características asociadas con las BP. Mientras que valores del índice negativos indican que la relación entre los dos grupos es menor que 1 y esto correlaciona con las MP.
Para validar el índice propuesto, se calcularon los valores para cada una de las muestras estudiadas en este trabajo. Utilizando los resultados de la cuantificación por qPCR para ambos grupos de bacterias se calcularon los valores correspondientes del índice según la ecuación, y se obtuvieron los valores de la figura 4.37.

De todos los valores obtenidos se encontró que solo tres no corresponden con lo esperado según el manejo del cual provienen los datos. Sin embargo, los valores restantes de los distintos tiempos para estas muestras responden de acuerdo a lo sugerido para el índice. Tanto para los resultados positivos (BP) como negativos (MP), se definieron intervalos de confianza (95%) para

el valor del índice. Teniendo en cuenta estos límites puede verse que claramente la mayoría de las muestras determinadas superan el valor crítico de dichos intervalos.

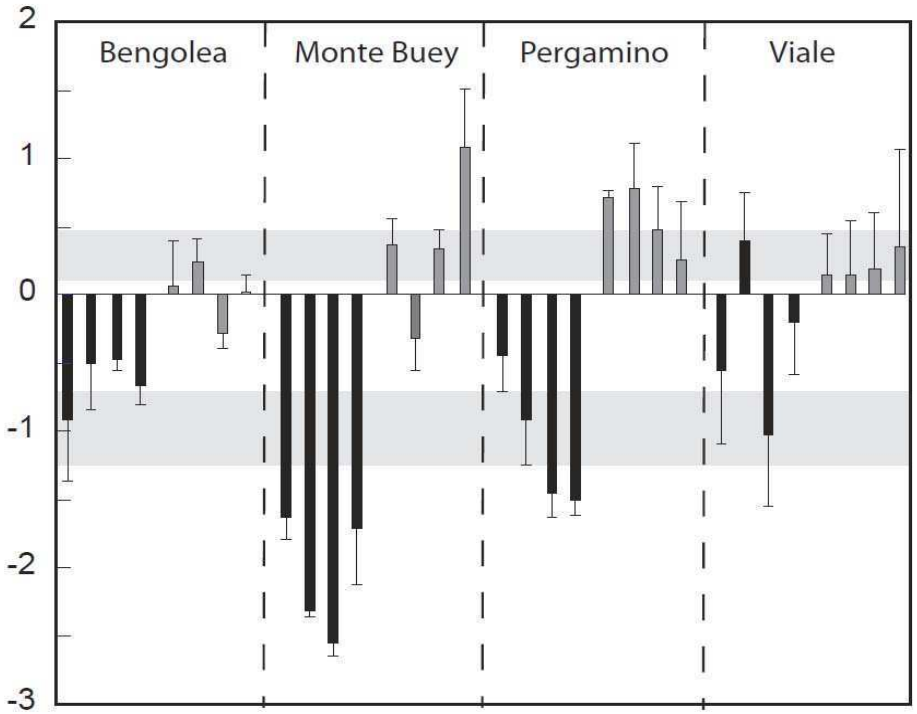

Fig. 4.37: Valores del indicador de tratamiento determinados para las muestras de suelo. Las cuatro barras de cada sitio y tratamiento corresponden a los distintos muestreos de izquierda a derecha. Las Malas Prácticas (MP) corresponden al color negro y las Buenas Prácticas (BP) al color gris. Los intervalos de confianza (95%) se indican en gris y corresponden a las BP (0,24; 0,71) y MP (-1,31; -0,41). Las barras representan el error estándar.

Discusión

En este trabajo nos hemos propuesto estudiar la composición de las comunidades bacterianas en suelos bajo distintos manejos agrícolas con el fin de comprender como estos manejos afectan a la diversidad y buscar variaciones en las comunidades de bacterias que puedan servir como indicadores biológicos de las prácticas a las que es sometido el suelo.

En los últimos años, frente al problema de una creciente demanda de alimentos, principalmente de granos, se incrementaron los efectos negativos sobre el suelo, tales como la erosión, la desertificación y la contaminación. Frente a estos problemas surgieron nuevas técnicas de cultivo más eficientes y una visión más amplia de los agroecosistemas, donde no solo son importantes las características de los cultivos, sino que también lo son los factores del suelo que permiten su utilización de forma sustentable (Kirschenmann 2010, Lal 2009). Por esto, aquellos factores que permiten conocer la calidad del suelo y predecir su desgaste, se han convertido en poderosas herramientas en la explotación agrícola (Bhardwaj 2011).

Se sabe que es extremadamente complejo estimar y estudiar la diversidad de bacterias en los suelos (Gans 2005), debido a muchos factores propios del ambiente y a las limitaciones de las técnicas utilizadas (Kakirde 2010, Delmont 2011, Terrat 2012).
Debido a que este estudio fue llevado a cabo sobre campos en producción, existe un componente de variabilidad adicional debido a diferencias en los ciclos de cultivo propios de cada campo, en contraste con lo que sucedería en un experimento diseñado en escala piloto. De los tres manejos definidos, MP y BP, y el control NA, las diferencias de cómo la actividad agrícola afecta a los suelos (suelos cultivado versus no cultivados) son claramente más simples de definir que las diferencias atribuibles a las diferencias entre buenas y malas prácticas agrícolas. La distinción entre estos dos sistemas de manejo se basa en el criterio de rotación de cultivos, fertilización, manejo de plagas y uso de agroquímicos, definido por Aapresid (www.aapresid.org.ar). Esta categorización, definida por dichos factores, tiene claros efectos sobre el rendimiento de los cultivos. Los datos muestran que los campos definidos como BP producen una mayor cantidad de granos (soja y maíz) que los lotes en las mismas áreas definidos como MP.

Según datos obtenidos por grupos de investigación especializados en las características físicas y químicas sobre las mismas muestras analizadas en este proyecto (Duval 2010, Duval 2012),

existen diferencias en la concentración de carbono orgánico entre los ambientes naturales (NA) y los ambientes bajo producción agrícola (BP y MP). Sin embargo este tipo de análisis no permite diferenciar entre los dos sistemas agrícolas que estudiamos. De las otras características químicas analizadas, como la concentración de N y P y el pH, ninguna presentó correlación con los factores que definen a los diferentes tratamientos.
En este contexto, encontrar marcadores biológicos que representen la situación real de sistemas de producción agraria es un enorme desafío.

A partir del ADN obtenido de las muestras de suelo se determinó la cantidad total de bacterias. Utilizando la técnica de qPCR se cuantificó la cantidad de copias del gen de ARNr 16S, considerado un buen estimador de poblaciones microbianas en muestras ambientales (Landeweert 2003, Bach 2002). En este estudio se encontró que el número de bacterias estimado en las muestras ronda en el orden de entre 10^9 y 10^{10} células por gramo de suelo. Estos valores concuerdan con los sugeridos por estudios de otros grupos de investigación para este tipo de ambientes (Torsvik 2002).
Los análisis estadísticos realizados sobre estos datos claramente mostraron que existe un efecto del uso de las tierras para cultivo sobre la concentración de bacterias cuando se compara con los ambientes naturales. Efectos similares han sido reportados por numerosos estudios en distintas partes del mundo (Gosai 2010, Roesch 2007, Jangid 2010, Lin 2011), postulando a la actividad agrícola como un importante factor modificador de la biología del suelo. Nuevamente, estas diferencias son visibles cuando se comparan sistemas muy distintos, pero no sucede lo mismo cuando se trata de ambientes que comparten muchas de sus características y las diferencias se deben a pocos factores, como sucede este trabajo entre los sistemas agrícolas de MP y BP. Al igual que lo que se vio para los principales indicadores químicos antes mencionados, el número de bacterias no es un buen indicador de diferencias entre distintos manejos bajo siembra directa.

Diversidad y composición de las comunidades de bacterias

Una de las principales características que se estudió es como las distintas condiciones del ambiente, ya sea producto de la variación geográfica o del efecto de los distintos manejos, afectan a la diversidad bacteriana (Ge 2008, Remenant 2009, Nemergut 2010). Para la microbiología ambiental una de las hipótesis ecológicas más interesantes es que si bien se

desconoce la relación entre diversidad taxonómica y función fisiológica para la inmensa mayoría de los grupos bacterianos, perturbaciones en el ambiente pueden generar cambios en la diversidad, y en muchos casos estos cambios están asociados a determinados grupos (George 2009, Fierer 2007, Schmid 2009). Por lo tanto se cree que a pesar de no conocer esa relación diversidad-función, los grupos taxonómicos responden de manera predecible a las modificaciones del ambiente (Lauber 2009).

Los valores de diversidad, estimados mediante curvas de rarefacción o índices de Shannon, que surgieron del análisis de los datos de pirosecuenciación, mostraron que a nivel de la comunidad de bacterias no existen diferencias significativas en la diversidad producto de las características propias de los distintos ambientes. Esto sugiere que las distintas regiones poseen características y condiciones capaces de mantener la misma diversidad bacteriana y que las perturbaciones que sufren como consecuencia de las diferentes prácticas agrícolas no tienen efectos marcados sobre dicha diversidad. Resultados similares fueron reportados en experimentos recientes comparando ambientes similares con distintos manejos (Yin 2010, Nacke 2011).

Sin embargo cuando se compararon las estructuras de los distintos taxones bacterianos se vio que claramente responden a un patrón de agrupamiento geográfico. Por lo tanto si bien la diversidad no se ve afectada, la estructura de las comunidades depende en mayor medida de las características regionales, que de los efectos de los distintos manejos del suelo.

La combinación de técnicas moleculares cualitativas y cuantitativas adoptada en este estudio permitió obtener un enfoque completo sobre la composición de las poblaciones bacterianas, comenzando desde la comunidad, para luego profundizar a niveles taxonómicos específicos. Otro aspecto que se tuvo en cuenta al diseñar el experimento fue la posibilidad de estudiar los cambios temporales. Para estudiar este efecto se utilizaron la técnica de qPCR permitió determinar las variaciones en la proporción de los distintos taxones y la técnica de DGGE para comparar la estructura de las comunidades entre los distintos muestreos.

Se encontró que los grupos mayoritarios en todos los suelos correspondieronn a los filos Actinobacteria, Proteobacteria (principalmente las clases Alfa y Beta), Acidobacteria y Firmicutes, los cuales en conjunto representan alrededor del 70% del total de bacterias. Esta información se corroboró tanto por los datos de pirosecuenciación como de qPCR. Los grupos

encontrados han sido comúnmente reportados en suelos como parte mayoritaria de las comunidades bacterianas (Nacke 2011, Tang 2009, Oline 2006, Acosta-Martinez 2010).

Se encontraron diferencias en determinados sitios para algunos filos y clases principales, por ejemplo Acidobacteria, donde las muestras de MP y BP de Monte Buey son claramente distintas, o las de Bengolea que muestran valores más altos de diversidad que el resto de los sitios. Sin embargo ni para este, ni para ninguno de los otros taxones se encontró un patrón reproducible asociado a los distintos sitios o tratamientos, sugiriendo que los factores que caracterizan a los distintos tratamientos no actúan de manera drástica sobre la diversidad de las poblaciones en los niveles taxonómicos superiores. Esto difiere con lo reportado en otros trabajos en los que se ha reportado que diferentes manejos afectan significativamente los valores de diversidad de grupos particulares. Actinobacteria, usualmente asociado con la degradación de sustratos complejos como celulosa y lignina, ha mostrado mayor diversidad en pasturas naturales que en sistemas de cultivo, especialmente monocultivo (Acosta-Martinez 2008). En el caso de Acidobacteria se ha visto que existe una alta correlación con el pH del suelo, pero esta relación es evidente solo con rangos relativamente amplios de pH (Jones 2009).

En la mayoría de los casos las diferencias en composición y abundancia de filos bacterianos entre sitios y tratamientos no fueron significativas, aunque para algunos grupos como Acidobacteria, Betaproteobacteria y Firmicutes se encontraron algunas diferencias en cantidad entre las distintas estaciones del año. Esto ha sido reportado en otros trabajos (Habekost 2008, Bell 2009) y se cree que tiene relación con la temperatura, las precipitaciones y la calidad y disponibilidad de sustratos. En nuestro caso las diferencias entre temporadas se caracterizan no solo por las diferencias climáticas, sino también por la ausencia o presencia de cultivos en las MP y cultivos de invierno o verano en las BP. Estas características generan condiciones distintas, lo que podría explicar las diferencias estacionales observadas. Sin embargo estas diferencias estacionales no parecen influir a largo plazo sobre la composición de las comunidades como lo hacen los distintos usos y manejos del suelo (Drenovsky 2010).

Cuando se estudió la estructura de los filos individuales mediante DGGE se pudo comparar el perfil de cada muestra a lo largo del tiempo, y también cuales eran las diferencias y similitudes que existían entre grupos de muestras según sitio o tratamiento.

En todos los casos se encontró que las muestras de distintos tiempos para el mismo sitio y tratamiento mostraban prácticamente el mismo patrón de bandas. Esto indica una gran estabilidad temporal en la composición de las poblaciones. A diferencia de lo observado por los datos cuantitativos, aquí los efectos de las estaciones no se hacen evidentes, sugiriendo que la composición taxonómica de la comunidad no se ve afectada de la misma manera que la abundancia relativa de los distintos grupos. Resultados similares fueron reportados para suelos trabajados con labranza convencional y muestras tomadas a intervalos similares a los de este trabajo (Smit 2001).

Otro resultado que se desprende de los análisis de DGGE-ANOSIM es que las comunidades pueden agruparse mejor según su similitud por sitios que por tratamientos. Estos datos, al igual que los datos de pirosecuenciación, afirman el marcado provincialismo biogeográfico que existe para las comunidades de estos suelos. Esto está en concordancia con numerosos reportes que sugieren que la biogeografía es uno de los principales componentes que influye sobre la estructura de las comunidades (Martiny 2006, Ge 2008, Dequiedt 2009, Bissett 2010, Nemergut 2011).

Al comparar las muestras agrupadas según los distintos manejos se encontró que en todos los casos las diferencias entre tratamientos no fueron significativas. Esto no significa que los distintos manejos no puedan estar afectando la estructura de la comunidad, si no que no lo hacen de forma drástica como para modificar completamente la estructura de la comunidad, establecida históricamente por factores biogeográficos. Esta estructuración jerárquica donde las características propias de los sitios predominan sobre los efectos de los tratamientos para dar forma a la estructura de las comunidades se ha visto en suelos tanto para el total de la población de bacterias, como para grupos específicos en escalas que van de decenas a cientos de kilómetros (Ge 2008, Lüke 2010, Ge 2010).

Una mirada más profunda a menores niveles de resolución filogenética indicó que para algunos taxones las muestras no solo se agruparon por sitios, sino que respondieron de forma consistente en todas las localidades frente a los tratamientos. La familia Xanthomonadaceae, mayoritaria dentro de la clase Gammaproteobacteria, mostró diferencias significativas en la cantidad de secuencias según los manejos agrícolas. Estos resultados se detectaron por pirosecuenciación

para el muestreo de Agosto de 2009 y se corroboraron por qPCR para todos los muestreos. A pesar de estos resultados no se encontraron indicios de que las diferencias dependan de un taxón en particular. Existen reportes previos de incrementos substanciales en la abundancia de miembros de esta familia como resultado del agregado de fertilizantes en suelos cultivables y en la tundra de Alaska (Jangid 2008, Campbell 2010). Algunos géneros de esta familia han sido aislados de suelos y suelen ser encontrados asociados con plantas, mostrando efectos beneficiosos para el crecimiento y salud de las plantas (Anandham 2008, Ryan 2009). Si bien las características de este grupo podrían sugerirlo como indicador biológico de tratamiento, las diferencias entre los manejos de MP y BP no son tan significativas como se las que se ven entre NA y MP. Esto limita la utilidad de esta familia como indicador de efectos de manejo agrícola, pero tal vez podría servir como marcador de efectos antrópicos.

Propuesta de indicadores de manejo agrícola

Otro objetivo importante de este trabajo fue determinar la existencia de grupos taxonómicos que a pesar de encontrarse bajo condiciones biogeográficas distintas (geografía, tipo de suelo, clima, etc.) respondiesen de la misma manera frente a las alteraciones producidas por determinados manejos a los que es sometido el suelo. Desde el punto de vista práctico, estos grupos serían importantes indicadores de calidad y de uso del suelo a escala regional. Algunas propiedades físicas, tales como estructura del suelo, capacidad de almacenamiento de agua y aireación, así como también las características químicas, son actualmente usadas como indicadores de la calidad del suelo. Sin embargo, las propiedades de los microorganismos son consideradas como más sensibles y consistentes para monitorear los efectos del manejo en la calidad del suelo (Garbisu 2011, Cluzeau 2012, Gómez-Sagasti 2012, Schimann 2012).

En este trabajo se utilizaron los datos de pirosecuenciación para detectar grupos de bacterias que pudiesen ser utilizados como indicadores biológicos utilizando el enfoque de índice del valor de indicador (IndVal) (Dufrene 1997). El uso del IndVal introdujo un enfoque que integra el grado de singularidad (especificidad) y la abundancia (fidelidad) de un taxón dentro de un hábitat determinado en un único valor indicador. Este método supera muchas de las limitaciones asociadas con los métodos paramétricos y multivariados, y es robusto en cuanto a las diferencias en número de sitio y abundancia de especies (McGeoch 1998). Debido a que cada valor es absoluto y se calcula de forma independiente de otros taxones, este enfoque ayuda a superar el

obstáculo impuesto por el escaso conocimiento sobre la taxonomía y ecología de las bacterias y se pueden realizar comparaciones directas entre los taxones en las diferentes comunidades sin ningún conocimiento previo sobre el papel funcional o respuesta anticipada del taxón a una perturbación. Además, para grandes cantidades de datos restringe el análisis a un menor número de taxones y reduce en gran medida los esfuerzos y costos de identificación de bioindicadores (O'Neill 2009).

En los últimos años numerosos trabajos han utilizado satisfactoriamente esta metodología para identificar la relación entre determinados organismos y características ecológicas del ambiente, tanto para plantas y animales (Penczak 2009, Lachat 2012, Jacot 2012) como para microorganismos, donde en muchos casos la capacidad técnica para obtener gran número de secuencias dificulta el análisis (Amend 2012, Keith 2011, Hartmann 2009, Koeppel 2012, Deslippe 2012).

En este trabajo se obtuvo una serie de taxones que cumplían con el criterio de selección para indicadores. En primer lugar, un grupo monofilético compuesto por 100 secuencias dentro de la clase Acidobacteria Gp1 y en segundo lugar el género *Rubellimicrobium* de las Alfaproteobacteria. En el primer caso se encontraban en grandes concentraciones en las BP y en bajas cantidades en las MP, mientras que sucedía a la inversa con el segundo. La abundancia de estos grupos bacterianos fueron corroboradas mediante qPCR y las diferencias resultaron significativas entre sitios y tratamientos en todos los casos.

Los resultados fueron similares a los observados en los análisis de DGGE de Acidobacteria, donde algunas de las bandas clasificadas como Gp1 mostraban el mismo comportamiento, y daban indicios de ser un posible candidato para ser considerado como indicador biológico. Acidobacteria Gp1 ha sido reportado como uno de los grupos más abundantes en suelos (Campbell 2010, Jesus 2009, George 2009, Eichorst 2011) y recientemente se han identificado como degradadores de celulosa en bosques de suelos ácidos (Stursová 2012). Sin embargo su función en suelos agrícolas no ha sido dilucidada y son necesarios más estudios que aporten información acerca de la ecología de este grupo particular.

Tampoco es bien conocido el hábitat del género *Rubellimicrobium.* Se conocen cuatro especies de este género, *R. thermophilum* (Denner 2006), *R. Aerolatum* (Weon 2009), *R. roseum* (Cao 2010) y *R. mesophilum* (Dastager 2008) de los cuales los dos últimos han sido aisladas de suelos. Un estudio reciente del impacto a largo tiempo de la agricultura sobre el suelo del desierto

mostró que *Rubellimicrobium* está entre las bacterias extremófilas que desaparecen del suelo con la agricultura (Köberl 2011). Estos resultados, en cierta forma concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo que muestran que este género predomina en los ambientes de MP donde las condiciones del suelo, lejos de ser similares a las de un desierto, son las menos favorables para los cultivos, con menor cobertura del suelo, menor retención de humedad y baja disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, será necesario el estudio de este grupo a través de técnicas genómicas y de cultivo para comprender mejor los aspectos ecológicos de estas bacterias en el suelo.

La información obtenida de estos análisis que muestra las diferencias entre la abundancia de bacterias en los diferentes tratamientos, sugiere que la combinación de ambos grupos podría servir como indicadores de manejo de suelos, al menos dentro de los límites comprendidos por la región agropecuaria pampeana donde fue realizado el estudio. De modo que utilizando esta información propusimos un índice que se calcula a partir de la relación entre las cantidades de Acidobacteria Gp1 y *Rubellimicrobium* normalizadas por las cantidades respectivas de cada taxón encontradas en ambientes naturales próximos al campo que se desea calificar, y transformada por aplicación del logaritmo. Este cálculo permite asignar a un suelo un valor que tiene directa relación con su estado y determinar si se trata de un suelo que ha sufrido un deficiente manejo y por consiguiente su calidad y productividad se vieron deterioradas.

Conclusiones y perspectivas

El extenso conocimiento y la información disponible sobre la diversidad del gen de ARNr 16S en combinación con el reciente desarrollo y aplicación en ecología microbiana de la pirosecuenciación (Sugiyama 2010, Nacke 2011, Tamaki 2011) y el uso de técnicas cuantitativas como la PCR en tiempo real han mostrado gran eficiencia al momento de estimar y comparar poblaciones microbianas en muestras ambientales (Philippot 2009, Maron 2011).

Los estudio de los suelos y los distintos procesos que dan forma a las comunidades que lo habitan no solo son importantes para comprender mejor los procesos biológicos, sino también para desarrollar políticas ambientales que preserven y aseguren la explotación sustentable de los ambientes naturales y agrícolas.

Este trabajo provee información relevante acerca de la distribución y respuesta de las comunidades de bacterias en suelos agrícolas manejados bajo distintos regimenes de siembra directa en la región agropecuaria pampeana. Los resultados obtenidos sugieren que las características de cada ambiente tienen efectos distintos sobre la abundancia de bacterias, de aquellos que se observan sobre la estructura taxonómica de las poblaciones. Estos resultados también han demostrado que las comunidades de bacterias en los suelos estudiados se estructuran principalmente por las características biogeográficas propias de cada localidad, pero distintos grupos responden de manera diferente frente a las condiciones generadas por los manejos agrícolas.

Los indicadores propuestos cumplen con muchos de los requerimientos necesarios para actuar como buenos indicadores ecológicos (Dale 2001, O'Neill 2009). Son fáciles de determinar, son sensibles frente a la acción de los manejos agrícolas, y proveen una adecuada cobertura sobre un relativamente amplio rango de variables ecológicas (ej. tipos de suelo, climas, tipos de cultivo, etc.).

En función a los resultados presentados, la necesidad de aumentar el número de muestras y extender estos análisis a otras regiones para tener una cobertura más amplia del comportamiento de estos indicadores propuestos, con el fin de validar su aplicación se convierte en uno de los objetivos principales para el desarrollo de nuevos proyectos de investigación.

Los datos obtenidos y las hipótesis y conclusiones planteadas en este trabajo podrán extenderse en el marco de un ámbito más amplio, dentro del consorcio BIOSPAS, para integrarse con los resultados provenientes de otras disciplinas y grupos de investigación y obtener una visión más global de los sistemas estudiados.

Bibliografía

Acosta-Martínez V, Dowd SE, Sun Y, Allen V. (2008). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. Soil Biology and Biochemistry 40:2762-2770.

Acosta-Martínez V, Dowd SE, Sun Y, Wester D, Allen V. (2010). Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system. Applied Soil Ecology 45:13-25.

Adams J. (2009). Species Richness. Springer - Praxis Publishing Ltd.: Chichester.

Ahn YH. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. Process Biochemistry 41:1709-1721.

Alvarez R, Steinbach H. (2006). Valor agronómico de la material orgánica. Capitulo 2 Materia Organica. Valor agronómico y dinámica en suelos pampeamos.

Amend AS, Barshis DJ, Oliver TA. (2012). Coral-associated marine fungi form novel lineages and heterogeneous assemblages. The ISME journal 6:1291-301.

Anandham R, Indiragandhi P, Madhaiyan M, Ryu KY, Jee HJ, Sa TM. (2008). Chemolithoautotrophic oxidation of thiosulfate and phylogenetic distribution of sulfur oxidation gene (soxB) in rhizobacteria isolated from crop plants. Research in Microbiology 159:579-89.

Anderson J. (1975). The enigma of soil animal species diversity. En: Progress in Soil Zoology, Vanek, J, (ed)., Junk Publishers: Prague.

Ashelford KE. (2002). PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. Nucleic Acids Research 30:3481-3489.

Askaer L, Elberling B, Glud RN, Kühl M, Lauritsen FR, Joensen HP. (2010). Soil heterogeneity effects on O2 distribution and CH4 emissions from wetlands: In situ and mesocosm studies with planar O2 optodes and membrane inlet mass spectrometry. Soil Biology and Biochemistry 42:2254-2265.

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, et al. (2004). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons.

Bach HJ, Tomanova J, Schloter M, Munch J. (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. Journal of Microbiological Methods 49:235-245.

Baker G, Smith JJ, Cowan DA. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. Journal of Microbiological Methods 55:541-555.

Bardgett RD, Frankland JC, Whittaker JB. (1993). The effects of agricultural management on the soil biota of some upland grasslands. Agriculture, Ecosystems & Environment 45:25-45.

Bardgett RD, Jones AC, Jones DL, Kemmitt SJ, Cook R, Hobbs PJ. (2001). Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. Soil Biology and Biochemistry 33:1653-1664.

Bardgett RD. (2005b). The biology of soil : a community and ecosystem approach. Oxford University Press: Oxford.

Bardgett RD, Usher MB, Hopkins DW. (2005). Biological Diversity and Function in Soils. Cambridge University Press: Cambridge.

Barnes RO, Goldberg ED. (1976). Methane production and consumption in anoxic marine sediments. Geology 4:297.

Barns SM, Takala SL, Kuske CR. (1999). Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. Applied and Environmental Microbiology 65:1731-7.

Bell CW, Acosta-Martinez V, McIntyre NE, Cox S, Tissue DT, Zak JC. (2009). Linking microbial community structure and function to seasonal differences in soil moisture and temperature in a Chihuahuan desert grassland. Microbial Ecology 58:827-42.

Beyaert RP, Schott JW, White PH. (2002). Tillage effects on corn production in a coarse-textured soil in Southern Ontario. Agronomy journal 94:767-774.

Bhardwaj AK, Jasrotia P, Hamilton SK, Robertson GP. (2011). Ecological management of intensively cropped agro-ecosystems improves soil quality with sustained productivity. Agriculture, Ecosystems & Environment 140:419-429.

Bissett A, Richardson AE, Baker G, Wakelin S, Thrall PH. (2010). Life history determines biogeographical patterns of soil bacterial communities over multiple spatial scales. Molecular Ecology 19:4315-4327.

Blackwood C, Oaks A. (2005). Phylum-and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. Applied and Environmental Microbiology71:6193-6198.

Bloem J, Hopkins DW, Benedetti A. (2006). Microbiological methods for assessing soil quality. CABI Publishing: London.

Bothe H, Jost G, Schloter M, Ward BB, Witzel KP. (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. FEMS Microbiology Reviews 24:673-690.

Bruns MA, Stephen JR, Kowalchuk GA, Prosser JI, Paul EA. (1999). Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. Applied and Environmental Microbiology 65:2994-3000.

Buckley DH, Huangyutitham V, Nelson TA, Rumberger A, Thies JE. (2006). Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. Applied and Environmental Microbiology 72:4522-31.

Buckley DH, Schmidt TM. (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. Environmental Microbiology 5:441-452.

Bäckman JSK, Hermansson A, Tebbe CC, Lindgren PE. (2003). Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidising bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE. Soil Biology and Biochemistry 35:1337-1347.

da C Jesus E, Marsh TL, Tiedje JM, de S Moreira FM. (2009). Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. The ISME journal 3:1004-11.

Campbell BJ, Polson SW, Hanson TE, Mack MC, Schuur EAG. (2010). The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. Environmental Microbiology 12:1842-1854.

Campbell C. A., Zentner RP, Liang BC, Roloff G, Gregorich EC, Blomert B. (2000). Organic C accumulation in soil over 30 years in semiarid southwestern Saskatchewan - effect of crop rotations and fertilizers. Canadian Journal of Soil Science 80:179-192.

Cao YR, Jiang Y, Wang Q, Tang SK, He WX, Xue QH, et al. (2010). Rubellimicrobium roseum sp. nov., a Gram-negative bacterium isolated from the forest soil sample. Antonie van Leeuwenhoek 98:389-94.

Cavigelli MA, Robertson GP. (2000). The Functional Significance of Denitrifier Community Composition in a terrestrial Ecosystem. Ecology 81:1402-1414.

Chen AC, Ueda K, Sekiguchi Y, Ohashi A, Harada H. (2003). Molecular detection and direct enumeration of methanogenic Archaea and methanotrophic Bacteria in domestic solid waste landfill soils. Biotechnology letters 25:1563-9.

Chen CY, Hansen KS, Hansen LK. (2008). Rhizobium radiobacter as an opportunistic pathogen in central venous catheter-associated bloodstream infection: case report and review. The Journal of Hospital Infection 68:203-7.

Chen X, Su Y, He X, Wei Y, Wei W, Wu J. (2011). Soil bacterial community composition and diversity respond to cultivation in Karst ecosystems. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28:205-213.

Chin KJ, Liesack W, Janssen PH. (2001). Opitutus terrae gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division “Verrucomicrobia” isolated from rice paddy soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:1965-8.

Cho JC, Tiedje JM. (2000). Biogeography and Degree of Endemicity of Fluorescent Pseudomonas Strains in Soil. Applied and Environmental Microbiology 66:5448-5456.

Clarke KR. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Australian Journal of Ecology 18:117-143.

Cluzeau D, Guernion M, Chaussod R, Martin-Laurent F, Villenave C, Cortet J, et al. (2012). Integration of biodiversity in soil quality monitoring: Baselines for microbial and soil fauna parameters for different land-use types. European Journal of Soil Biology 49:63-72.

Coenye T, Vandamme P. (2003). Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. Environmental Microbiology 5:719-729.

Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis Bruijn, FJD, ed. Nucleic Acids Research 37:D141-D145.

Coleman DC, Crossley DA, Hendrix PF. (2004). Fundamentals of soil ecology. Second Edi. Elsevier Academic Press: Burlington.

Collins WW, Qualset CO. (1999). Biodiversity in agroecosystems. CRC Press LLC.: Boca Raton.

Czarnetzki AB, Tebbe CC. (2004). Diversity of bacteria associated with Collembola - a cultivation-independent survey based on PCR-amplified 16S rRNA genes. FEMS Microbiology Ecology 49:217-27.

De Cáceres M, Legendre P. (2009). Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. Ecology 90:3566-74.

De Cáceres M, Legendre P, Moretti M. (2010). Improving indicator species analysis by combining groups of sites. Oikos 119:1674-1684.

Dale VH, Beyeler SC. (2001). Challenges in the development and use of ecological indicators. Ecological Indicators 1:3-10.

Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, Thamdrup B, Acuña-González J. (2003). N2 production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. Nature 422:606-8.

Dastager SG, Lee JC, Ju YJ, Park DJ, Kim CJ. (2008). Rubellimicrobium mesophilum sp. nov., a mesophilic, pigmented bacterium isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58:1797-800.

DeAngelis KM, Allgaier M, Chavarria Y, Fortney JL, Hugenholtz P, Simmons B, et al. (2011). Characterization of trapped lignin-degrading microbes in tropical forest soil. Rao, CV, ed. PloS one 6:e19306.

Delmont TO, Robe P, Cecillon S, Clark IM, Constancias F, Simonet P, et al. (2011). Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. Applied and Environmental Microbiology 77:1315-1324.

Denner EBM, Kolari M, Hoornstra D, Tsitko I, Kämpfer P, Busse HJ, et al. (2006). Rubellimicrobium thermophilum gen. nov., sp. nov., a red-pigmented, moderately thermophilic bacterium isolated from coloured slime deposits in paper machines. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56:1355-62.

Dequiedt S, Thioulouse J, Jolivet C, Saby NPA, Lelievre M, Maron PA, et al. (2009). Biogeographical patterns of soil bacterial communities. Environmental Microbiology Reports 1:251-255.

Deslippe JR, Hartmann M, Simard SW, Mohn WW. (2012). Long-term warming alters the composition of Arctic soil microbial communities. FEMS Microbiology Ecology.

Desvaux M. (2005). Clostridium cellulolyticum: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. FEMS Microbiology Reviews 29:741-64.

Dinh HT, Kuever J, Mussmann M, Hassel AW, Stratmann M, Widdel Friedrich. (2004). Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. Nature 427:829-32.

Dlamini TC, Haynes RJ. (2004). Influence of agricultural land use on the size and composition of earthworm communities in northern KwaZulu-Natal, South Africa. Applied Soil Ecology 27:77-88.

Dorak MT. (2007). Real-Time PCR. Taylor & Francis Group: Abingdon UK.

Doran JW. (1987). Microbial biomass and mineralizable nitrogen distributions in no-tillage and plowed soils. Biology and Fertility of Soils 5.

Drenovsky RE, Steenwerth KL, Jackson LE, Scow KM. (2010). Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. Global Ecology and Biogeography 19:27-39.

Dufrêne M, Legendre P. (1997). Species Assemblages and Indicator Species: The Need for a Flexible Asymmetrical Approach. Ecological Monographs 67:345-366.

Duval M, Galantini J, Wall L, Martinez J, Iglesias J, Canelo S. (2012). Fracciones orgánicas como indicadores de calidad de suelos bajo siembra directa. XIX Congreso Latinoamericano y XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata. 16 al 20 de abril.

Duval M, Martinez J, Galantini J. (2010). Contenido, calidad y dinámica de las fracciones orgánicas como indicadores de la calidad de los suelos en siembra directa. XXII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Rosario. 31de mayo al 4 de junio.

Eichorst SA, Kuske CR, Schmidt TM. (2011). Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum Acidobacteria. Applied and Environmental Microbiology 77:586-96.

Elliott LF, Lynch JM. (1994). Biodiversity and soil resilience. En: Soil Resilience and Sustainable Use Land. Green-land DJ, Szabolcs I, (ed)., CAB International, Wallingford, UK

Ernst G, Emmerling C. (2009). Impact of five different tillage systems on soil organic carbon content and the density, biomass, and community composition of earthworms after a ten year period. European Journal of Soil Biology 45:247-251.

Errouissi F, Ben Moussa-Machraoui S, Ben-Hammouda M, Nouira S. (2011). Soil invertebrates in durum wheat (Triticum durum L.) cropping system under Mediterranean semi arid conditions: A comparison between conventional and no-tillage management. Soil and Tillage Research 112:122-132.

Ettema CH, Wardle DA. (2002). Spatial soil ecology. Trends in Ecology & Evolution 17:177-183.

FAO Committee on Agriculture (COAG). (2003)."Development of a Framework for Good Agricultural Practices". Seventeenth Session, Rome , 13 March-4 April

Feinstein LM, Sul WJ, Blackwood CB. (2009). Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. Applied and Environmental Microbiology 75:5428-33.

Fierer N, Jackson J, Vilgalys R, Jackson RB. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. Applied and Environmental Microbiology 71:4117-4120.

Fierer N, Schimel JP, Holden PA. (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. Soil Biology and Biochemistry 35:167-176.

Finlay BJ, Esteban GF, Olmo JL, Tyler PA. (1999). Global distribution of free-living microbial species. Ecography 22:138-144.

Finlay BJ. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. Science (New York, N.Y.) 296:1061-3.

Foissner W. (1999). Protist diversity: estimates of the near-imponderable. Protist 150:363-8.

Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. The ISME journal 1:19-27.

Franklin RB, Mills AL. (2003). Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. FEMS Microbiology Ecology 44:335-46.

Freitag TE, Chang L, Clegg CD, Prosser JI. (2005). Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. Applied and Environmental Microbiology 71:8323-34.

Frostegård A, Courtois S, Ramisse V, Clerc S, Bernillon D, Le Gall F, et al. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. Applied and Environmental Microbiology 65:5409-20.

Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science (New York, N.Y.) 309:1387-90.

Garbisu C, Alkorta I, Epelde L. (2011). Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance. Applied Soil Ecology 49:1-4.

Ge Y, Chen C, Xu Z, Oren R, He JZ. (2010). The spatial factor, rather than elevated CO_2, controls the soil bacterial community in a temperate Forest Ecosystem. Applied and Environmental Microbiology 76:7429-36.

Ge Y, He JZ, Zhu YG, Zhang JB, Xu Z, Zhang LM, et al. (2008). Differences in soil bacterial diversity: driven by contemporary disturbances or historical contingencies? The ISME journal 2:254-264.

George IF, Liles MR, Hartmann M, Ludwig W, Goodman RM, Agathos SN. (2009). Changes in soil Acidobacteria communities after 2,4,6-trinitrotoluene contamination. FEMS Microbiology Letters 296:159-66.

Gesch RW, Cermak SC, Isbell TA, Forcella F. (2005). Seed yield and oil content of cuphea as affected by harvest date. Agronomy journal 97:817-822.

Gich F, Garcia-Gil J, Overmann J. (2001). Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. Archives of Microbiology 177:1-10.

Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Seoane S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. Soil Biology and Biochemistry 37:877-887.

Glockner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R. (2000). Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of Actinobacteria. Applied and Environmental Microbiology 66:5053-5065.

Gnanamanickam SS. (2006). Plant-Associated Bacteria. Springer Netherlands: Dordrecht.

Goodfellow M, Williams ST. (1983). Ecology of actinomycetes. Annual Review of Microbiology 37:189-216.

Gosai K, Arunachalam A, Dutta BK. (2010). Tillage effects on soil microbial biomass in a rainfed agricultural system of northeast India. Soil and Tillage Research 109:68-74.

Gowing JW, Palmer M. (2008). Sustainable agricultural development in sub-Saharan Africa: the case for a paradigm shift in land husbandry. Soil Use and Management 24:92-99.

Grant CA, Peterson GA, Campbell Constantine A. (2002). Nutrient considerations for diversified cropping systems in the Northern Great Plains. Agronomy journal 94:186-198.

Gremion F, Chatzinotas A, Harms H. (2003). Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. Environmental Microbiology 5:896-907.

Gupta RS. (2000). The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. FEMS Microbiology Reviews 24:367-402.

Gómez-Sagasti MT, Alkorta I, Becerril JM, Epelde L, Anza M, Garbisu C. (2012). Microbial Monitoring of the Recovery of Soil Quality During Heavy Metal Phytoremediation. Water, Air, & Soil Pollution 223:3249-3262.

Habekost M, Eisenhauer N, Scheu S, Steinbeiss S, Weigelt A, Gleixner G. (2008). Seasonal changes in the soil microbial community in a grassland plant diversity gradient four years after establishment. Soil Biology and Biochemistry 40:2588-2595.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Paleontologia Electronica 4:9.

Hansen RA. (2000). Effects of Habitat Complexity and Composition on a Diverse Litter Microarthropod assemblage. Ecology 81:1120-1132.

Hartmann M, Lee S, Hallam SJ, Mohn WW. (2009). Bacterial, archaeal and eukaryal community structures throughout soil horizons of harvested and naturally disturbed forest stands. Environmental Microbiology 11:3045-62.

Hedlund BP, Gosink JJ, Staley JT. (1997). Verrucomicrobia div. nov., a new division of the bacteria containing three new species of Prosthecobacter. Antonie van Leeuwenhoek 72:29-38.

Holmes AJ, Bowyer J, Holley MP, O'Donoghue M, Montgomery M, Gillings MR. (2000). Diverse, yet-to-be-cultured members of the Rubrobacter subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. FEMS Microbiology Ecology 33:111-120.

Horner-Devine MC, Carney KM, Bohannan BJM. (2004). An ecological perspective on bacterial biodiversity. Proceedings. Biological sciences / The Royal Society 271:113-22.

Jacot K, Eggenschwiler L, Beerli C, Bosshard A, Suter M. (2012). Significance of different types of meadow edges for plant diversity in the Swiss Alps. Agriculture, Ecosystems & Environment 153:75-81.

Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, Sanderlin J, Reeves J, Jenkins M, et al. (2008). Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. Soil Biology and Biochemistry 40:2843-2853.

Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, Schmidt TM, Coleman DC, Whitman WB. (2011). Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. Soil Biology and Biochemistry 43:2184-2193.

Janssen PH. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology 72:1719-28.

Jenkins SN, Waite IS, Blackburn A, Husband R, Rushton SP, Manning DC, et al. (2009). Actinobacterial community dynamics in long term managed grasslands. Antonie van Leeuwenhoek 95:319-34.

Jenny H. (1941). Factors of Soil Formation. McGraw Hill: New York.

Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J. (2003). The hidden lifestyles of Bacillus cereus and relatives. Environmental Microbiology 5:631-40.

Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. (2009). A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. The ISME journal 3:442-53.

Kakirde KS, Parsley LC, Liles MR. (2010). Size Does Matter: Application-driven Approaches for Soil Metagenomics. Soil biology & biochemistry 42:1911-1923.

Keith AM, Boots B, Hazard C, Niechoj R, Arroyo J, Bending GD, et al. (2011). Cross-taxa congruence, indicators and environmental gradients in soils under agricultural and extensive land management. European Journal of Soil Biology 49:55-62.

Kennedy AC, Papendick RI. (1995). Microbial characteristics of soil quality. Journal of Soil and Water Conservation 50:243-248.

Kennedy AC, Smith KL. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. Plant and Soil 170:75-86.

Kielak A, Pijl AS, van Veen J a, Kowalchuk GA. (2009). Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. The ISME journal 3:378-82.

Kielak A, Rodrigues JLM, Kuramae EE, Chain PSG, van Veen Johannes A, Kowalchuk GA. (2010). Phylogenetic and metagenomic analysis of Verrucomicrobia in former agricultural grassland soil. FEMS Microbiology Ecology 71:23-33.

Kirschenmann F. (2010). Alternative agriculture in an energy- and resource-depleting future. Renewable Agriculture and Food Systems 25:85-89.

Koeppel AF, Wu M. (2012). Lineage-dependent ecological coherence in bacteria. FEMS Microbiology Ecology.

Koops HP, Pommerening-Röser A. (2001). Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. FEMS Microbiology Ecology 37:1-9.

Krüger M, Meyerdierks A, Glöckner FO, Amann R, Widdel Friedrich, Kube M, et al. (2003). A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. Nature 426:878-81.

Köberl M, Müller H, Ramadan EM, Berg G. (2011). Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. Gilbert, JA, ed. PloS one 6:e24452.

Lachat T, Wermelinger B, Gossner MM, Bussler H, Isacsson G, Müller J. (2012). Saproxylic beetles as indicator species for dead-wood amount and temperature in European beech forests. Ecological Indicators 23:323-331.

Lal R. (2009). Sustainable Agriculture. Springer Netherlands: Dordrecht.

Landeweert R, Veenman C, Kuyper TW, Fritze H, Wernars K, Smit E. (2003). Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by real-time PCR compared to conventional quantification techniques. FEMS Microbiology Ecology 45:283-92.

Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Applied and Environmental Microbiology 75:5111-20.

Lavelle P, Spain AV. (2003). Soil Ecology. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.

Lednická D, Mergaert J, Cnockaert MC, Swings J. (2000). Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria Involved in the Degradation of Natural Cellulosic Fibres. Systematic and Applied Microbiology 23:292-299.

Lee ZMP, Bussema C, Schmidt TM. (2009). rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. Nucleic Acids Research 37:D489-93.

Leff JW, Nemergut DR, Grandy AS, O'Neill SP, Wickings K, Townsend AR, et al. (2011). The Effects of Soil Bacterial Community Structure on Decomposition in a Tropical Rain Forest. Ecosystems 15:284-298.

Li T, Wu TD, Mazéas L, Toffin L, Guerquin-Kern JL, Leblon G, et al. (2008). Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. Environmental Microbiology 10:580-8.

Lin Y, Kong H, Wu D, Li C, Wang R, Tanaka S. (2010). Physiological and molecular biological characteristics of heterotrophic ammonia oxidation by Bacillus sp. LY. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26:1605-1612.

Lin YT, Jangid Kamlesh, Whitman WB, Coleman DC, Chiu CY. (2011). Soil bacterial communities in native and regenerated perhumid montane forests. Applied Soil Ecology 47:111-118.

Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès JP, et al. (2006). Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. Environmental Microbiology 8:720-731.

Lu Y, Rosencrantz D, Liesack Werner, Conrad R. (2006). Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. Environmental Microbiology 8:1351-60.

Ludwig B, Geisseler D, Michel K, Joergensen RG, Schulz E, Merbach I, et al. (2010). Effects of fertilization and soil management on crop yields and carbon stabilization in soils. A review. Agronomy for Sustainable Development 31:361-372.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66:506-577.

Lüke C, Krause S, Cavigiolo S, Greppi D, Lupotto E, Frenzel P. (2010). Biogeography of wetland rice methanotrophs. Environmental Microbiology 12:862-72.

Malézieux E, Crozat Y, Dupraz C, Laurans M, Makowski D, Ozier-Lafontaine H, et al. (2009). Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. Agronomy for Sustainable Development 29:43-62.

Mano H, Morisaki H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes and Environments JSME 23:109-17.

Maron PA, Mougel C, Ranjard L. (2011). Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. Comptes Rendus Biologies 334:403-11.

Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL, et al. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. Nature reviews. Microbiology 4:102-12.

Martínez-Romero E. (2009). Coevolution in Rhizobium-legume symbiosis? DNA and Cell Biology 28:361-70.

McGeoch MA, Chown SL. (1998). Scaling up the value of bioindicators. Trends in Ecology & Evolution 13:46-7.

Le Mer J, Roger P. (2001). Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. European Journal of Soil Biology 37:25-50.

Mozafar A, Anken T, Ruh R, Frossard E. (2000). Tillage intensity, mycorrhizal and nonmycorrhizal fungi, and nutrient concentrations in maize, wheat, and canola. Agronomy journal 92:1117-1124.

Mulder A, Graaf AA, Robertson LA, Kuenen JG. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. FEMS Microbiology Ecology 16:177-184.

Nacke H, Thürmer A, Wollherr A, Will C, Hodac L, Herold N, et al. (2011). Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. PloS one 6:e17000.

Nauhaus K, Boetius A, Kruger M, Widdel F. (2002). In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. Environmental Microbiology 4:296-305.

Nemergut DR, Cleveland CC, Wieder WR, Washenberger CL, Townsend AR. (2010). Plot-scale manipulations of organic matter inputs to soils correlate with shifts in microbial community composition in a lowland tropical rain forest. Soil Biology and Biochemistry 42:2153-2160.

Nemergut DR, Costello EK, Hamady M, Lozupone C, Jiang L, Schmidt SK, et al. (2011). Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. Environmental Microbiology 13:135-44.

Oline DK. (2006). Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils. Applied and Environmental Microbiology 72:6965-71.

O'Neill KP, Godwin HW, Jiménez-Esquilín AE, Battigelli JP. (2009). Reducing the dimensionality of soil microinvertebrate community datasets using Indicator Species Analysis: Implications for ecosystem monitoring and soil management. Soil Biology and Biochemistry 42:145-154.

Pariona-Llanos R, Ibañez de Santi Ferrara F, Soto Gonzales HH, Barbosa HR. (2010). Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. European Journal of Soil Biology 46:387-393.

Paul E. (2007). Soil microbiology, ecology, and biochemistry. Third Edit. Elsevier: Oxford, UK.

Penczak T. (2009). Fish assemblage compositions after implementation of the IndVal method on the Narew River system. Ecological Modelling 220:419-423.

Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, Tebbe CC. (2000). Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology 66:930-6.

Philippot L, Bru D, Saby NPA, Cuhel J, Arrouays D, Simek M, et al. (2009). Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. Environmental Microbiology 11:3096-104.

Philippot L, Hallin S. (2005). Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. Current Opinion in Microbiology 8:234-9.

Phillips CJ, Harris D, Dollhopf SL, Gross KL, Prosser JI, Paul EA. (2000). Effects of Agronomic Treatments on Structure and Function of Ammonia-Oxidizing Communities. Applied and Environmental Microbiology 66:5410-5418.

Ponge JF. (2003). Humus forms in terrestrial ecosystems: a framework to biodiversity. Soil Biology and Biochemistry 35:935-945.

Prosser JI, Embley TM. (2002). Cultivation-based and molecular approaches to characterisation of terrestrial and aquatic nitrifiers. Antonie van Leeuwenhoek 81:165-79.

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, et al. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Research 35:7188-96.

Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, Wagner M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. Applied and Environmental Microbiology 66:5368-82.

Quaiser A, Ochsenreiter T, Lanz C, Schuster SC, Treusch AH, Eck J, et al. (2003). Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. Molecular Microbiology 50:563-575.

R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org/

Ratering S, Schnell S. (2001). Nitrate-dependent iron(II) oxidation in paddy soil. Environmental Microbiology 3:100-109.

Remenant B, Grundmann GL, Jocteur-Monrozier L. (2009). From the micro-scale to the habitat: Assessment of soil bacterial community structure as shown by soil structure directed sampling. Soil Biology and Biochemistry 41:29-36.

Reysenbach AL, Pace NR. (1995). Archaea: A Laboratory Manual. Spring Harbour Laboratory Press: New York.

Rheims H, Felske A, Seufert S, Stackebrandt E. (1999). Molecular monitoring of an uncultured group of the class Actinobacteria in two terrestrial environments. Journal of Microbiological Methods 36:65-75.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. http://www.infostat.com.ar.

Ritz K, McNicol JW, Nunan N, Grayston S, Millard P, Atkinson D, et al. (2004). Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in an upland grassland. FEMS Microbiology Ecology 49:191-205.

Robertson LA, Kuenen JG. (1990). Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in Thiosphaera pantotropha and other bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 57:139-152.

Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, et al. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. The ISME journal 1:283-90.

Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, et al. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. The ISME journal 4:1340-51.

Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, et al. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus Stenotrophomonas. Nature reviews. Microbiology 7:514-25.

Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.

Salles JF, van Veen JA, van Elsas JD. (2004). Multivariate analyses of Burkholderia species in soil: effect of crop and land use history. Applied and Environmental Microbiology 70:4012-20.

Sangwan P, Kovac S, Davis KER, Sait M, Janssen PH. (2005). Detection and cultivation of soil verrucomicrobia. Applied and Environmental Microbiology 71:8402-10.

Schimann H, Petit-Jean C, Guitet S, Reis T, Domenach AM, Roggy JC. (2012). Microbial bioindicators of soil functioning after disturbance: The case of gold mining in tropical rainforests of French Guiana. Ecological Indicators 20:34-41.

Schlatter D, Fubuh A, Xiao K, Hernandez D, Hobbie S, Kinkel L. (2009). Resource amendments influence density and competitive phenotypes of Streptomyces in soil. Microbial ecology 57:413-20.

Schlesner H, Jenkins C, Staley J. (2006). The Phylum Verrucomicrobia: A Phylogenetically Heterogeneous Bacterial Group en The Prokaryotes. Springer New York: NY.

Schlesner H. (1987). Verrucomicrobium spinosum gen. nov., sp. nov.: a Fimbriated Prosthecate Bacterium. Systematic and Applied Microbiology 10:54-56.

Schloss PD, Handelsman J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. Applied and Environmental Microbiology 71:1501-6.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Corradini, F & Polzonetti, A, eds. Applied and Environmental Microbiology 75:7537-7541.

Schmalenberger A, Tebbe CC. (2003). Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. Molecular Ecology 12:251-262.

Schmid B, Balvanera P, Cardinale BJ, Godbold J, Pfisterer AB, Raffaelli D, et al. (2009). Consequences of species loss for ecosystem functioning: meta-analyses of data from biodiversity experiments. En: Biodiversity, Ecosystem Functioning, and Human Wellbeing. An Ecological

and Economic Perspective, Naeem, S, Bunker, DE, Hector, A, Loreau, M, & Perrings, C, (ed)., Oxford University Press.

Simard SW, Durall DM. (2004). Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. Canadian Journal of Botany 82:26.

Smit E, Leeflang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S, Wernars K. (2001). Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. Applied and Environmental Microbiology 67:2284-91.

Straub K, Benz M, Schink B, Widdel F. (1996). Anaerobic, Nitrate-Dependent Microbial Oxidation of Ferrous Iron. Appl. Envir. Microbiol. 62:1458-1460.

Strous M, Jetten MSM. (2004). Anaerobic oxidation of methane and ammonium. Annual Review of Microbiology 58:99-117.

Stursová M, Zifčáková L, Leigh MB, Burgess R, Baldrian P. (2012). Cellulose utilisation in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. FEMS Microbiology Ecology 80:735-46.

Sugiyama A, Vivanco J, Jayanty S. (2010). Pyrosequencing assessment of soil microbial communities in organic and conventional potato farms. Plant 1-35.

Tamaki H, Wright CL, Li X, Lin Q, Hwang C, Wang S, et al. (2011). Analysis of 16S rRNA Amplicon Sequencing Options on the Roche/454 Next-Generation Titanium Sequencing Platform Moustafa, A, ed. PLoS ONE 6:e25263.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular biology and evolution 24:1596-9.

Tang H, Xiao C, Ma J, Yu M, Li Y, Wang G, et al. (2009). Prokaryotic diversity in continuous cropping and rotational cropping soybean soil. FEMS Microbiology Letters 298:267-73.

Terrat S, Christen R, Dequiedt S, Lelièvre M, Nowak V, Regnier T, et al. (2012). Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. Microbial Biotechnology 5:135-41.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22:4673-4680.

Torsvik V, Øvreås L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Current Opinion in Microbiology 5:240-5.

Triplett GB, Dick WA. (2008). No-Tillage Crop Production : A Revolution in Agriculture! Agronomy journal 100.

Tuomela M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresource Technology 72:169-183.

Turner MG, Gardner RH, O'Neill RV. (2001). Landscape Ecology in Theory and Practice: Pattern and Process. Springer.

Ulrich A, Wirth S. (1999). Phylogenetic Diversity and Population Densities of Culturable Cellulolytic Soil Bacteria across an Agricultural Encatchment. Microbial Ecology 37:238-247.

Vandekerckhove TTM, Coomans A, Cornelis K, Baert P, Gillis M. (2002). Use of the Verrucomicrobia-specific probe EUB338-III and fluorescent in situ hybridization for detection of "Candidatus Xiphinematobacter" cells in nematode hosts. Applied and Environmental Microbiology 68:3121-5.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, et al. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiology and Molecular Biology Reviews 71:495-548.

Verhoeven KJF, Simonsen KL, McIntyre LM. (2005). Implementing false discovery rate control: increasing your power. Oikos 108:643-647.

Vestberg M, Kukkonen S, Saari K, Tuovinen T, Palojärvi A, Pitkänen T, et al. (2009). Effects of cropping history and peat amendments on the quality of a silt soil cropped with strawberries. Applied Soil Ecology 42:37-47.

Vitousek PM. (2004). Nutrient Cycling and Limitation: Hawaii as a Model System. Princeton University Press

Wall DH, Moore JC. (1999). Interactions Underground: Soil Biodiversity, Mutualism, and Ecosystem Processes. Bioscience 49:109-117.

Wall LG. (2011). The BIOSPAS Consortium: Soil Biology and Agricultural Production. En: Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches, Bruijin FJ, (ed)., John Wiley & Sons: Hoboken, USA.

Wang J, Jenkins C, Webb RI, Fuerst JA. (2002). Isolation of Gemmata-Like and Isosphaera-Like Planctomycete Bacteria from Soil and Freshwater. Applied and Environmental Microbiology 68:417-422.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology 73:5261-5267.

Wang XJ, Yang J, Chen XP, Sun GX, Zhu YG. (2009). Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China. Journal of Soils and Sediments 9:568-577.

Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, Henrissat B, Coutinho PM, Wu M, et al. (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. Applied and Environmental Microbiology 75:2046-56.

Weber P, Bardgett RD. (2011). Influence of single trees on spatial and temporal patterns of belowground properties in native pine forest. Soil Biology and Biochemistry 43:1372-1378.

Webster G, Embley TM, Prosser JI. (2002). Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of beta-proteobacterial ammonia pxidizer populations. Applied and Environmental Microbiology 68:20-30.

Weon HY, Son JA, Yoo SH, Hong SB, Jeon YA, Kwon SW, et al. (2009). Rubellimicrobium aerolatum sp. nov., isolated from an air sample in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:406-10.

Werner D, Newton WE. (2005). Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. Springer-Verlag: Berlin.

Widdel F, Schnell S, Heising S, Ehrenreich A, Assmus B, Schink B. (1993). Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. Nature 362:834-836.

Wilbur WJ. (1983). Rapid Similarity Searches of Nucleic Acid and Protein Data Banks. Proceedings of the National Academy of Sciences 80:726-730.

Will C, Thürmer A, Wollherr A, Nacke H, Herold N, Schrumpf M, et al. (2010). Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology 76:6751-9.

Wirth S, Ulrich A. (2002). Cellulose-Degrading Potentials and Phylogenetic Classification of Carboxymethyl-cellulose Decomposing Bacteria Isolated from Soil. Systematic and Applied Microbiology 25:584-591.

Yin C, Jones KL, Peterson DE, Garrett K a., Hulbert SH, Paulitz TC. (2010). Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. Soil Biology and Biochemistry 42:2111-2118.

Yin X, Vyn TJ. (2002). Soybean responses to potassium placement and tillage alternatives following no-till. Agronomy journal 94:1367-1374.

Zavarzin GA, Stackebrandt E., Murray RGE. (1991). A correlation of phylogenetic diversity in the Proteobacteria with the influences of ecological forces. Canadian Journal of Microbiology 37:1-6.

Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. Environmental Microbiology 5:539-554.

Zhang J, Wu P, Hao B, Yu Z. (2011). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium Pseudomonas stutzeri YZN-001. Bioresource Technology 102:9866-9.

Zuur AF, Ieno EN, Walker N, Saveliev AA, Smith GM. (2009). Mixed Effects Models and Extensions in Ecology With R. Springer.