



**DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

*Tesis de Doctor en Agronomía*

**Evaluación de comunidades microbianas en suelos  
semiáridos del Sur-Oeste Bonaerense, bajo distintos  
sistemas de manejo agrícola**

**Magalí Vercellino**

**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2019**



# PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento de Agronomía de esta Universidad, durante el período comprendido entre Septiembre de 2009 y Febrero de 2015, bajo la dirección de la Dra. Marisa A. Gómez.”

Magalí Vercellino

DNI 30.232.536

Bahía Blanca, 14 de Mayo de 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ..... / ..... / ..... , mereciendo la calificación de ..... (.....)

**Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.**

Dra. Marisa Anahí Gómez

*A mis padres*

*"At the beginning don't worry so much about what you want to do for a career. It will work itself out in the end. Just remember to enjoy what you do and always give your best."*

Jay L. Garland

# AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis fue posible gracias al soporte de distintas instituciones científico - académicas y al apoyo de muchas personas que me formaron, asesoraron, acompañaron, y orientaron durante el transcurso de la misma.

En primer lugar, mi agradecimiento, cariño y respeto a mi directora, Dra. Marisa A. Gómez. Por darme la oportunidad de hacer esta investigación, creciendo académica y personalmente, y por su paciencia, apoyo y comprensión en cada etapa de la tesis.

Agradezco de forma especial al Dr. Hugo R. Krüger por la disponibilidad del sitio de estudio que dirige en INTA-EEA Bordenave, y por estar siempre dispuesto a ayudar.

Doy gracias a mis asesores, Dres. Oscar Bravo y M. Rosa Landriscini, por las sugerencias para la realización de la tesis; y a todos los profesores de posgrado que contribuyeron a mi formación académica.

Agradezco también al personal del Laboratorio de Manejo y Conservación de Suelos de INTA-EEA Bordenave por su colaboración durante los muestreos y análisis; y al Lic. Ricardo Camina del Departamento de Matemática de la Universidad Nacional del Sur (UNS), por su gran ayuda en el análisis estadístico.

Diversas personas pertenecientes al Departamento de Agronomía (DA), al Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) y al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS, han colaborado para llevar a cabo diferentes actividades. Gracias a Mónica Baldini, Miriam Crespo, M. Amelia Cubitto, Pablo Cutini, Claudio Ferrarello, Maximiliano Garay, Roberto Kiessling, Mercedes Ron, Martín Sarti y Pablo Zalba.

Quiero agradecer a todos los compañeros de laboratorio que he tenido durante el transcurso de la tesis, Miguel Alvarado, Leticia Fernández, Florencia Hirsfeld, Gastón Iocoli, Diego Knell, Daniela Muro Schenfeldt, Teresa Pérez, M. Emilia Rinland, Carmen Salerno, M. Celina Zabaloy y Ana M. Zamponi, por los momentos compartidos y la ayuda brindada.

Mi gratitud al DA-UNS, por aportar sus instalaciones y equipamiento para realizar este trabajo de investigación, y financiarlo a través del proyecto de la Secretaría de Ciencia y

Tecnología de la UNS PGI N° 24/A146: “Biodiversidad de comunidades microbianas del suelo en los sistemas agrícolas. Funciones biodegradativas de agroquímicos y de residuos orgánicos.” Asimismo reconozco al CONICET, por el otorgamiento de las Becas Internas Tipo I y Tipo II, durante la realización de este posgrado.

Agradezco especialmente al jurado revisor del manuscrito, por el aporte invaluable que hicieron al mismo, brindando críticas y sugerencias desde su amplia experiencia científico-académica en el campo de las ciencias agronómicas y biológicas, que sin dudas hicieron que este trabajo tenga mayor valor y rigor científico.

Finalmente, mi agradecimiento a aquellas personas que me acompañan en la vida. A familiares y amigos, por la presencia y el amor que me brindan, eso da las fuerzas para seguir adquiriendo desafíos y crecer cada día un poco más. A Vicente, por su amor diario, por entenderme y hacerme confiar que este día algún día llegaría.

# RESUMEN

El manejo de los suelos puede impactar sobre la composición y actividad de las comunidades microbianas, en consecuencia existe preocupación sobre el uso responsable y mantenimiento de la diversidad microbiana de los suelos agrícolas para un manejo sustentable del agroecosistema. En esta tesis se trabajó en un ensayo de sistemas de labranza en sistemas mixtos del Sur-Oeste Bonaerense iniciado en el año 1999. Ante la falta de antecedentes a nivel microbiológico en el ensayo, siendo que los microorganismos cumplen un rol fundamental en los agroecosistemas, se decidió evaluar cómo afectan los sistemas de manejo agrícola a la abundancia de grupos funcionales microbianos (Bacterias Nitrificantes [BN], Reductoras de Nitrato [BRN] y Desnitrificantes [BD]) y a la actividad microbiana a través de la liberación de dióxido de carbono. Paralelamente se evaluó en los suelos la presencia del gen *amoA* que codifica para el sitio activo de la enzima Amonio Monooxigenasa, y de los genes que codifican para las enzimas de las diferentes etapas de la desnitrificación, y se aislaron y caracterizaron bacterias potencialmente desnitrificantes. Además, en esta tesis se diseñó un ensayo de degradación de rastrojo en microcosmos, para evaluar el efecto de diferentes niveles de humedad y de fertilización en el suelo sobre la actividad microbiana, analizando la actividad enzimática y la biomasa activa.

Los primeros dos años de muestreo (2009 y 2010) se caracterizaron por tener escasez de lluvia. Mostraron baja abundancia de la microbiota y en general en cada fecha individual de muestreo no se detectaron efectos de los sistemas de manejo, sino que la variación estuvo dada entre fechas de muestreos. En el caso de las BN no se pudo estimar el número, lo cual se adjudica a la dificultad para cultivar estas bacterias, y su alta dependencia a una adecuada humedad en el suelo. El tercer año (2011), hubo mayores precipitaciones, sin embargo, en pocas ocasiones se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de una misma fecha de muestreo, y tal como sucedió en los primeros años, la variación se dio entre fechas. La respiración basal del suelo en general fue mayor en los primeros 5 cm del suelo y bajo siembra directa; y en el caso del manejo del verdeo, se detectó mayor respiración en los suelos no pastoreados. Los estudios con tecnología independiente de

cultivo revelaron la presencia de BN con secuencia del gen *amoA* altamente conservada, a diferencia de las BD que mostraron mayor variación en la secuencia del gen *nosZ*. Se caracterizaron morfológicamente los aislamientos potencialmente desnitrificadores, los cuales presentaron diferentes modelos de crecimiento. De los cincuenta y siete aislamientos obtenidos, en más de la mitad se confirmó la presencia tanto del gen *nirK* como *nosZ* (que codifican para las enzimas nitrito reductasa de cobre y óxido nitroso reductasa, respectivamente), mientras que en el resto solo se detectó el primero de ellos, lo que indica la presencia de bacterias desnitrificadoras parciales (presencia de *nirK*) y completas (presencia de *nirK* y *nosZ*). Además, las cepas desnitrificadoras completas mostraron variaciones fisiológicas, tanto en formas de crecimiento como en el consumo de sustratos carbonados; y se secuenciaron e identificaron tres aislamientos (*Cellulosimicrobium* sp. NEAU-Z02, *Bacillus pumilus* strain UFV-E34 y *Stenotrophomonas* sp. CK6), que ya han sido encontrados en suelos, y han sido estudiados por su capacidad reductora de nitrato y desnitrificante. Finalmente, el estudio en microcosmos, mostró que las variables evaluadas son sensibles a los niveles de humedad en el suelo y que la degradación de rastrojo en este tipo de suelos es lenta.

En conclusión, en estos ambientes frágiles las condiciones ambientales generadas por la marcada estacionalidad influyen en la dinámica microbiana, e incluso pueden superar los efectos de manejo del suelo. En los suelos semiáridos bonaerenses evaluados es factible la incorporación de la siembra directa, mientras que la incorporación de animales para pastoreo puede generar condiciones favorables para el desarrollo de BRN y BD, lo que puede provocar pérdidas de nitrógeno.

# ABSTRACT

Soil management can impact on microbial communities's composition and activity, therefore there is concern about the responsible use and maintenance of the microbial diversity of agricultural soils for a sustainable management of the agroecosystem. This Thesis was done on a trial of tillage systems in mixed systems of the South-West of Buenos Aires started in 1999. Given the absence of microbiological antecedents, being that microorganisms play a fundamental role in agroecosystems, it was decided to evaluate how agricultural management systems affect the abundance of microbial functional groups (Nitrifying Bacteria [BN], Nitrate Reducing Bacteria [BRN] and Denitrifying Bacteria [BD]) and microbial activity through carbon dioxide's release. At the same time, the presence of the *amoA* gene that codes for the active site of the enzyme Ammonium Monooxygenase, and of the genes that code for the enzymes of the different denitrification stages was evaluated, and potentially denitrifying bacteria were isolated and characterized. In addition, it was designed a trial of degradation of stubble in microcosms, to evaluate the effect of different levels of moisture and fertilization in the soil on microbial activity, analyzing the enzymatic activity and active biomass.

The first two years of sampling (2009 and 2010) were characterized by low rainfall. They showed low abundance of the microbiota and in general, on each individual sampling date, no effects of the management systems were detected, but the variation was given between sampling dates. Abundance of BN could not be estimated, which is attributed to the difficulty in cultivating these bacteria, and their high dependence on adequate soil moisture. The third year (2011), there was greater rainfall, however, in few occasions significant differences were found between the treatments of the same sampling date, and as it happened in the first years, the variation occurred between dates. The basal respiration of the soil in general was greater in the first 5 cm of the soil and under zero-tillage; and in the case of greening management, greater respiration was detected in ungrazed soils. The studies with independent culture technology revealed the presence of BN with sequence of the highly conserved *amoA* gene, unlike the BD that showed greater variation in the

sequence of the *nosZ* gene. Potentially denitrifying isolates, which presented different growth models, were morphologically characterized. Of the fifty-seven isolates obtained, more than half confirmed the presence of both *nirK* and *nosZ* genes (which encode the copper nitrite reductase and nitrous oxide reductase enzymes, respectively), while in the rest it was only detected the first one, which indicates the presence of partial denitrifying bacteria (presence of *nirK*) and complete bacteria (presence of *nirK* and *nosZ*). In addition, the complete denitrifying strains showed physiological variations, both in growth forms and in the consumption of carbon substrates; and three isolates, which have already been found in soils and have been studied for their nitrate-reducing and denitrifying capacity, were identified (*Cellulosimicrobium* sp. NEAU-Z02, *Bacillus pumilus* strain UFV-E34 and *Stenotrophomonas* sp. CK6). Finally, the study in microcosms showed that the evaluated variables are sensitive to soil moisture levels and that the stubble degradation in this type of soil is slow.

In conclusion, in these fragile environments the environmental conditions generated by the marked seasonality influence the microbial dynamics, and can even overcome the effects of soil management. In the evaluated semi-arid soils of Buenos Aires, the incorporation of zero-tillage is feasible, while the incorporation of animals for grazing can generate favorable conditions for the development of BRN and BD, which can cause nitrogen losses.

# ÍNDICE GENERAL

<b>PREFACIO</b> .....	III
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	VI
<b>RESUMEN</b> .....	VIII
<b>ABSTRACT</b> .....	X
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	XII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	XV
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	XVIII
<b>Capítulo 1</b> Introducción general .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.1.1 Los sistemas de manejo agrícola .....	1
1.1.2 Efectos de los sistemas de manejo sobre las comunidades microbianas .....	7
1.2. Evaluación microbiológica del suelo.....	8
1.2.1 Planes para estudiar los microorganismos del suelo .....	9
1.2.2 Limitaciones en los estudios de diversidad microbiana .....	12
1.3. Comunidades microbianas en el metabolismo del nitrógeno .....	13
1.3.1 El ciclo biológico del nitrógeno.....	14
1.3.2 Nitrificación.....	15
1.3.3 Desnitrificación.....	16
1.4. Fundamentos del problema. Hipótesis y objetivos generales .....	21
1.5. Diagramación de la tesis.....	22
<b>Capítulo 2</b> Sitio de estudio y ensayo de labranzas .....	24
2.1 Sitio de Estudio .....	24
2.1.1 Localización .....	24
2.1.2 Condiciones climáticas.....	24
2.1.3 Características físicas y químicas .....	26

2.2	Ensayo de Labranzas .....	28
2.2.1	Descripción del Ensayo.....	28
2.2.2	Historia del Ensayo: Manejo del Suelo y Cultivos .....	30
2.2.3	Antecedentes del Ensayo.....	30
2.3	Diseño de muestreo .....	32
<b>Capítulo 3</b> Abundancia y respiración microbiana en suelos con diferente manejo agrícola .....		35
3.1	Introducción.....	35
3.2	Materiales y Métodos .....	38
3.2.1	Muestreo de suelos y determinación de humedad .....	38
3.2.2	Nitrógeno disponible en el suelo .....	38
3.2.3	Análisis de la microbiota heterótrofa aerobia .....	40
3.2.4	Análisis de las comunidades nitrificadoras, reductoras de nitrato y desnitrificadoras.....	41
3.2.5	Análisis estadístico.....	49
3.3	Resultados.....	50
3.3.1	Humedad en las muestras de suelo .....	50
3.3.2	Nitrógeno disponible en el suelo .....	51
3.3.3	Abundancia y respiración de la microbiota heterótrofa aerobia .....	54
3.3.4	Comunidades nitrificadoras, reductoras de nitrato y desnitrificantes .....	62
3.3.5	Análisis de Componentes Principales .....	70
3.4	Discusión .....	72
3.5	Conclusión .....	84
<b>Capítulo 4</b> Aislamiento y caracterización de bacterias con capacidad desnitrificante.....		85
4.1	Introducción.....	85
4.2	Materiales y Métodos .....	87
4.2.1	Obtención de Aislamientos .....	87
4.2.2	Caracterización molecular de los aislamientos.....	88
4.2.3	Caracterización fisiológica de los aislamientos.....	90
4.2.4	Secuenciación e identificación de aislamientos.....	92
4.3	Resultados.....	93
4.3.1	Aislamiento de bacterias desnitrificantes y caracterización molecular.....	93
4.3.2	Caracterización fisiológica de los aislamientos.....	98

4.3.3	Identificación de cepas bacterianas.....	105
4.4	Discusión .....	105
4.5	Conclusiones.....	108
<b>Capítulo 5</b> Actividad biológica en la degradación de rastrojo.....		109
5.1.	Introducción .....	109
5.2.	Materiales y Métodos .....	111
5.2.1	Preparación de microcosmos.....	111
5.2.2	Degradación del rastrojo .....	113
5.2.3	Respiración inducida por sustrato.....	114
5.2.4	Determinación de la actividad enzimática.....	115
5.2.5	Análisis estadístico.....	117
5.3.	Resultados.....	118
5.3.1	Degradación del rastrojo .....	118
5.3.2	Respiración Inducida por Sustrato .....	119
5.3.3	Actividad deshidrogenasa.....	120
5.3.4	Actividad ureásica.....	121
5.4.	Discusión .....	123
5.5.	Conclusiones .....	128
<b>Capítulo 6</b> Conclusiones generales .....		129
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....		131
<b>ANEXO</b> .....		147

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Evolución de la superficie bajo SD, en Argentina desde 1977 hasta 2017. (a) Superficie en hectáreas, (b) Superficie en porcentaje (Nocelli Pac, 2018). .....	3
<b>Figura 1.2</b> La caja negra del suelo. Los microbiólogos del suelo abrieron nuevas ventanas para investigar las comunidades microbianas del suelo, su composición y funciones. <i>PLFA</i> , ácidos grasos fosfolipídicos; <i>CLPP</i> , perfil fisiológico de la comunidad (Insam, 2001). .....	9
<b>Figura 1.3</b> Procesos microbianos que contribuyen al ciclo biológico del nitrógeno (Philippot y Hallin, 2006). .....	15
<b>Figura 1.4</b> Cascada de la desnitrificación con las diferentes enzimas reductasas y el nombre de los genes que codifican las correspondientes subunidades catalíticas (en paréntesis) (Philippot y col., 2007). .....	18
<b>Figura 1.5</b> Arreglo básico de las reductasas y pasos en la transferencia de electrones de Nitrito reductasas (a), Nitrito reductasas (b) y, Óxido nítrico reductasa y Óxido nitroso reductasa (c) (compilado de Shapleigh, 2013). .....	18
<b>Figura 2.1</b> Fotografía del sitio de estudio en la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Bordenave. ....	25
<b>Figura 2.2</b> Localización geográfica del sitio de estudio. ....	25
<b>Figura 2.3</b> Precipitaciones medias anuales en EEA INTA Bordenave durante el período 1911-2011. ....	26
<b>Figura 2.4</b> Esquema del diseño experimental del ensayo de labranzas. ....	29
<b>Figura 2.5</b> Precipitaciones mensuales de los años 2009, 2010 y 2011, y promedio histórico mensual. ....	33
<b>Figura 3.1</b> Procedimiento para el análisis de las comunidades bacterianas con un enfoque basado en PCR. ....	43
<b>Figura 3.2</b> Nitrógeno disponible ( $N_{disp}$ ) ( $kg\ ha^{-1}$ ) en promedio para cada fecha de muestreo. Las barras de error representan $\pm 1$ E.S. ( $n=36$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos. ....	51
<b>Figura 3.3</b> Nitrógeno disponible ( $N_{disp}$ ) ( $kg\ ha^{-1}$ ) en suelos bajo Labranza Convencional (LC) y Siembra Directa (SD), sometidos a Pastoreo directo (P) o corte mecánico del forraje (NoP), para las muestras tomadas a la profundidad de 0-5 cm (a) y 5-20 cm (b) durante el año 2011. Las barras representan $\pm 1$ E.S. ( $n=6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas (*, $p<0,05$ ; **, $p<0,01$ ) entre los laboreos dentro de cada muestreo. ....	53
<b>Figura 3.4</b> Nitrógeno disponible ( $kg\ ha^{-1}$ ) en promedio para todos los tratamientos a dos profundidades de muestreo (0-5 cm y 5-20 cm), para las muestras tomadas durante el año 2011. Las barras representan $\pm 1$ E.S. ( $n=12$ ). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ( $p<0,01$ ) entre los promedios de las profundidades dentro de cada muestreo. ....	54
<b>Figura 3.5</b> Abundancia de Bacterias Heterotróficas Aerobias (BHA) en promedio para cada fecha de muestreo. Las barras de error representan $\pm 1$ E.S. ( $n=36$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos. ....	55
<b>Figura 3.6</b> Abundancia de Bacterias Heterotróficas Aerobias (BHA) en promedio para cada fecha de muestreo del año 2011 según (a) el efecto del manejo del verdeo y (b) el nivel de profundidad de muestreo. Las barras representan $\pm 1$ E.S. ( $n=12$ ). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas dentro de cada muestreo ( $p<0,05$ ). ....	56

**Figura 3.7** Respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) en suelos bajo Labranza Convencional (LC) y Siembra Directa (SD), sometidos a Pastoreo directo (P) o corte mecánico del forraje (NoP), para el último muestreo del año 2009 (BOR2) y los muestreos del año 2010 (BOR3 y BOR4). Las barras de error muestran  $\pm 1$  E.S. ( $n=3$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los promedios de los laboreos (\*\*,  $p<0,01$ ) y los manejos de verdeo (\*,  $p<0,05$ ) dentro de cada muestreo. .... 58

**Figura 3.8** Respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) en promedio para todos los tratamientos a dos profundidades de muestreo (0-5 cm y 5-20 cm), para las muestras tomadas durante el año 2011. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=12$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos, para cada profundidad. .... 59

**Figura 3.9** Respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) en suelos bajo Labranza Convencional (LC) y Siembra Directa (SD), para las muestras tomadas a la profundidad de 0-5 cm durante el año 2011. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas (\*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ ) dentro de cada muestreo. .... 60

**Figura 3.10** Respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) en suelos sometidos a Pastoreo directo (P) o corte mecánico del forraje (NoP), para las muestras tomadas a la profundidad de 0-5 cm durante el año 2011. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=6$ ). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p<0,01$ ) dentro de cada muestreo. .... 61

**Figura 3.11** Respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) en suelos bajo Labranza Convencional (LC) y Siembra Directa (SD), sometidos a Pastoreo directo (P) o corte mecánico del forraje (NoP), para las muestras tomadas a la profundidad de 5-20 cm durante el año 2011. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=3$ ). .... 61

**Figura 3.12** Abundancia de Bacterias Reductoras de Nitrato (BRN), en promedio para (a) cada fecha de muestreo (BOR1, BOR2, BOR3 y BOR4); y (b) cada tratamiento (SD, siembra directa; LC, labranza convencional; P, pastoreado; NoP, No pastoreado) de los años 2009 y 2010. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=36$ ). Distintas letras representan diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre los muestreos (a) y los tratamientos (b). .... 63

**Figura 3.13** Abundancia de Bacterias Desnitrificadoras (BD) en promedio para cada fecha de muestreo (BOR1, BOR2, BOR3 y BOR4) de los años 2009 y 2010. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=36$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos. .... 64

**Figura 3.14** Abundancia de Bacterias Reductoras de Nitrato (BRN) (a) y Bacterias Desnitrificadoras (BD) (b) en promedio para cada fecha de muestreo. Las barras de error representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=24$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos. .... 65

**Figura 3.15** Electroforesis en gel de los productos PCR del gen *amoA* de 12 muestras de suelo bajo distintos sistemas de manejo del quinto muestreo del año 2011 (BOR9), un control positivo y un control negativo. El tamaño de las bandas corresponde al esperado (491 bp). MM = Marcador de peso molecular (50 – 1500 bp) de Fermentas. SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado; NoP, No pastoreado. .... 67

**Figura 3.16** Electroforesis en gel de diluciones (1:100 y 1:250) de los productos PCR del gen *nosZ* de muestras de suelo bajo distintos sistemas de manejo en el primer, tercer y quinto muestreo del año 2011 (BOR5, BOR7 y BOR9, respectivamente), un control positivo y un control negativo. Los fragmentos amplificaron cerca del valor esperado (267 bp). MM = Marcador de peso molecular VIII (19 – 1110 bp) de Roche. I, Bloque I; SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado; NoP, No pastoreado. .... 68

**Figura 3.17** Perfil de restricción con la enzima *BsuRI* del gen *nosZ* de muestras de suelo (Bloque I: SD-P, SD-NoP y LC-NoP; Bloque II: SD-NoP, LC-P), aislamientos (A10 y A11) y *B. diazoefficiens* sp. nov. USDA110 (USDA110). MM = Marcador de peso molecular VIII (19 - 1110

bp) de Roche. SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado; NoP, No pastoreado.....69

**Figura 3.18** Representación de las variables en el plano de las dos primeras componentes principales (92,3%) (% Hum, porcentaje de humedad en el suelo; BHA, densidad de bacterias heterótrofas aerobias; BRN, densidad de bacterias reductoras de nitrato; BD, densidad de bacterias desnitrificantes; Ndisp, nitrógeno disponible en el suelo)..... 71

**Figura 4.1** Procedimiento seguido para aislamiento de bacterias desnitrificantes del suelo. ....88

**Figura 4.2** Electroforesis en gel de los productos PCR del gen *nirK* de 4 aislamientos, 1 cepa de referencia y control negativo. El tamaño de las bandas corresponde al valor esperado (514 bp). MM = Marcador de peso molecular (50 - 1500 bp) de Fermentas. .... 96

**Figura 4.3** Electroforesis en gel de los productos PCR del gen *nosZ* de 8 aislamientos, 1 cepa de referencia y control negativo. El tamaño de las bandas corresponde al valor esperado (~267 bp). MM = Marcador de peso molecular (50 - 1,500 bp) de Fermentas. .... 96

**Figura 4.4** Curvas de crecimiento de las 32 cepas desnitrificadoras según los modelos de crecimiento lento (a), rápido (b), especial (c) y lineal (d). ....99

**Figura 4.5** Dendrograma mostrando la relación fenotípica, basado en la utilización de 28 fuentes carbonadas y la distancia Euclídea, entre 32 aislamientos y 5 cepas de colección (*Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. USDA110 (USDA110), *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 (USDA122) y *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 (USDA6)). El análisis de agrupamiento se realizó usando el Ligamiento Promedio (UPGMA). El coeficiente de correlación cofenética (r) fue 0,768..... 100

**Figura 4.6** Representación de los 32 aislamientos y 5 cepas de colección (*Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. USDA110 (USDA110), *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 (USDA122) y *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 (USDA6)) en el plano de las dos primeras componentes principales (CP), calculadas usando la matriz de covarianzas construida en base a cada dato de sustrato metabolizado. Se muestra entre paréntesis el porcentaje de la varianza explicado por cada CP. Rombos amarillos (♦): tipo de sustrato. Rombos azules (◆): cepas..... 103

**Figura 5.1** Ensayo de microcosmos de suelo..... 111

**Figura 5.2** Curva estándar de calibración de la absorbancia a 485 nm en función de la concentración de 2,3,5-trifenilformazán en acetona. .... 115

**Figura 5.3** Curva estándar de calibración de la absorbancia a 525 nm en función de la concentración de urea en solución de KCl-acetato fenilmercurio..... 117

**Figura 5.4** Evolución en el tiempo de la pérdida de masa seca de rastrojo (g), bajo diferentes dosis de agua y fertilización. Las barras de error muestran  $\pm 1$  E.S. (n=3). .... 118

**Figura 5.5** Respiración Inducida por Sustrato (SIR) ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ ) en el tiempo, bajo diferentes dosis de agua y fertilización. Las barras de error muestran  $\pm 1$  E.S. (n=3). .... 119

**Figura 5.6** Efecto de tres dosis de agua sobre la actividad deshidrogenasa (DHA) ( $\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) a las 2, 4, 8 y 16 semanas (a, b, c y d, respectivamente) de iniciado el ensayo en microcosmos de suelo. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. (n=6). Distintas letras representan diferencias significativas entre las dosis de agua, para cada etapa de muestreo..... 121

**Figura 5.7** Efecto de tres dosis de agua sobre la actividad ureásica ( $\mu\text{g urea hidrolizada g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ ) a las 2, 4, 8 y 16 semanas (a, b, c y d, respectivamente) de iniciado el ensayo en microcosmos de suelo. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. (n=6 para a, c y d; n=3 para b). Distintas letras representan diferencias significativas entre las dosis de agua, para cada etapa de muestreo; en b) letras minúsculas para muestras sin fertilizar y letras mayúsculas para muestras fertilizadas. n.s= no significativo..... 122

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b> Características del horizonte superficial del suelo en el sitio de estudio (COT, Carbono Orgánico Total; P, Fósforo).....	27
<b>Tabla 2.2</b> Parámetros hídricos en el sitio de estudio (Prof, Profundidad; Hum, Humedad; CC, Capacidad de Campo; PMP, Punto de Marchitez Permanente; DA, Densidad Aparente; CAU, Capacidad de Almacenamiento de agua Útil). ....	27
<b>Tabla 2.3</b> Fechas de muestreo, estación climática y profundidad.....	32
<b>Tabla 3.1</b> Ajustes químicos, térmicos y de tiempos, para la reacción de PCR de los genes <i>narG</i> , <i>nirK</i> y <i>nosZ</i> . ....	46
<b>Tabla 3.2</b> Mezcla de PCR para la amplificación de los genes <i>amoA</i> , <i>narG</i> , <i>nirK</i> , <i>nirS</i> y <i>nosZ</i> .....	47
<b>Tabla 3.3</b> Condiciones de PCR para la amplificación de ADNr <i>amoA</i> , <i>narG</i> , <i>nirK</i> , <i>nirS</i> y <i>nosZ</i> . .	48
<b>Tabla 3.4</b> Tamaño de los fragmentos (bp) del gen <i>nosZ</i> amplificados en suelos bajo distintos sistemas de manejo en el primer, tercer y quinto muestreo del año 2011 (BOR5, BOR7 y BOR9, respectivamente). I, Bloque I; SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado; NoP, No pastoreado. ....	68
<b>Tabla 3.5</b> RFLP del gen <i>nosZ</i> en cinco muestras de suelo bajo distintos sistemas de manejo (SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado, NoP, No Pastoreado), dos aislamientos desnitrificantes del mismo suelo (A10 y A11) y <i>B. diazoefficiens</i> sp. nov. USDA110 (USDA110). ....	70
<b>Tabla 3.6</b> Matriz de coeficientes de correlación entre las variables (% Hum, porcentaje de humedad en el suelo; BHA, densidad de bacterias heterótrofas aerobias; BRN, densidad de bacterias reductoras de nitrato; BD, densidad de bacterias desnitrificantes; Ndisp, nitrógeno disponible en el suelo).....	72
<b>Tabla 3.7</b> Matriz de probabilidades de correlación entre las variables (% Hum, porcentaje de humedad en el suelo; BHA, densidad de bacterias heterótrofas aerobias; BRN, densidad de bacterias reductoras de nitrato; BD, densidad de bacterias desnitrificantes; Ndisp, nitrógeno disponible en el suelo).....	72
<b>Tabla 4.1</b> Condiciones de PCR para la amplificación de ADNr 16S e ITS.....	89
<b>Tabla 4.2</b> Sustratos carbonados utilizados, clasificados de acuerdo a su naturaleza química. ....	91
<b>Tabla 4.3</b> Procedencia de las cepas obtenidas por métodos dependientes de cultivo y las confirmadas como desnitrificadoras por métodos moleculares. ....	94
<b>Tabla 4.4</b> Tamaño de los fragmentos amplificados (bp) de los genes <i>nirK</i> y <i>nosZ</i> para las 32 cepas desnitrificadoras.....	95
<b>Tabla 4.5</b> Patrón de bandas del 16S-23S ITS de los 32 aislamientos desnitrificantes. [Aislamiento (Tamaño banda) (bp)]. ....	97
<b>Tabla 4.6</b> Resultados del análisis de componentes principales, correlación cofenética = 0,931, considerando las 28 fuentes carbonadas que fueron utilizadas y las 37 cepas (32 aislamientos y 5 cepas de colección). ....	104
<b>Tabla 5.1</b> Lluvias registradas (mm) en el primer semestre en años seleccionados para el ensayo <i>in vitro</i> . ....	112
<b>Tabla 5.2</b> Diseño experimental (N=12). ....	113

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. Antecedentes

#### 1.1.1 Los sistemas de manejo agrícola

El rendimiento del suelo, entendido como la producción obtenida en una superficie específica, juega un papel vital en el desarrollo y la supervivencia de las civilizaciones, así como en la provisión de alimentos y otros bienes esenciales para los seres humanos. El suelo es un recurso no renovable, con tasas de degradación relativamente rápida, y procesos de regeneración y formación extremadamente lentos. Por lo tanto, el uso sostenible de los suelos es la única solución para hacer frente a cuestiones globales como la seguridad alimentaria, las demandas de energía y agua, el cambio climático y la biodiversidad [1].

La sustentabilidad se define como la capacidad de un sistema para mantener la productividad a pesar de grandes perturbaciones, tales como el estrés intensivo o una gran alteración [2]. La sostenibilidad de un sistema productivo tiene como requisito esencial que las reservas de nutrientes y la materia orgánica del suelo sean conservadas a largo plazo. Para producir mejor y en forma continuada, se deben recuperar los suelos y mantenerlos sanos a perpetuidad. Las alternativas de recuperación de suelos, deberán ser necesariamente un sistema o un esquema agrícola conservacionista y rentable a la vez [3]. La frecuencia, intensidad y tipo de labranza afectan las propiedades químicas, físicas y biológicas de los suelos. Estos cambios pueden reflejarse en la disponibilidad de nutrientes, la producción de cultivos y, más tardíamente, en la sustentabilidad del sistema productivo [4].

La palabra labrar deriva del latín *laborāre*, que tiene el significado genérico de trabajar [5]. La labranza es una práctica fundamental en el manejo agrícola; y por lo tanto, se puede definir como un método de "trabajar" el suelo ya sea físicamente, químicamente, mecánicamente o biológicamente que tiene como principal objetivo crear las condiciones

adecuadas para la germinación de las plántulas, establecimiento y crecimiento [6]. Otras finalidades son incorporar materia orgánica, favorecer la entrada y acumulación de agua para las plantas, mejorar las condiciones de aireación, y combatir algunas malezas, plagas y enfermedades que puedan atacar al próximo cultivo [7].

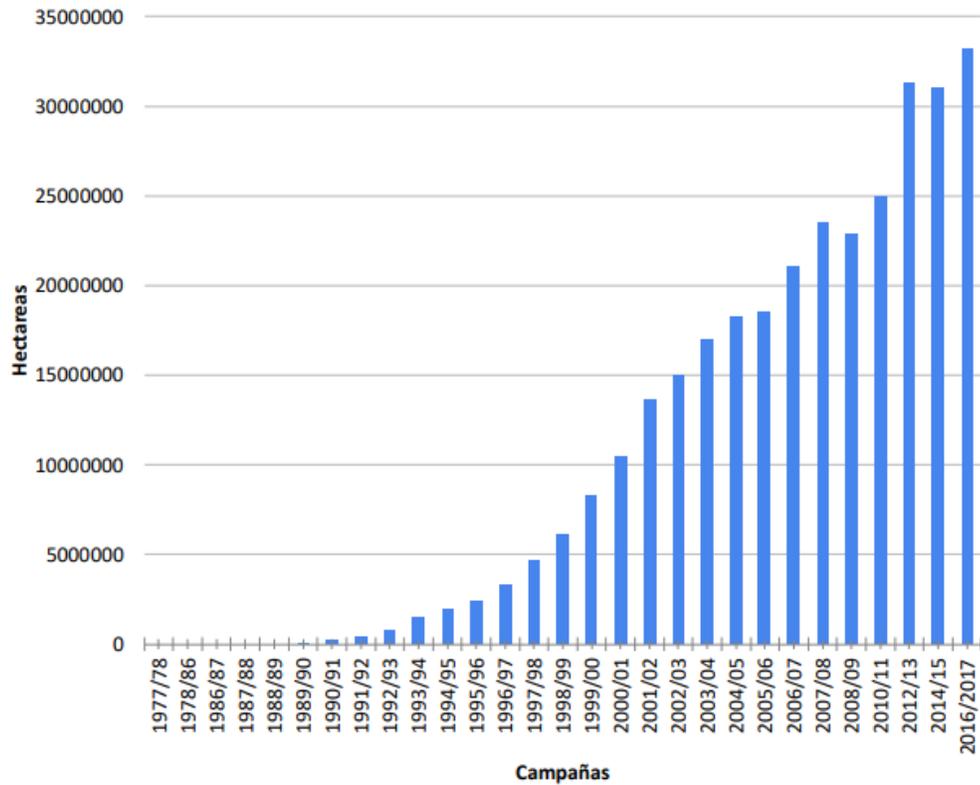
Existen diferentes tipos de labranza que pueden diferenciarse según el objetivo de la misma, la intensidad o cantidad de labores que se hagan, o el volumen de suelo afectado con la labor. En la labranza convencional (LC) se realizan cinco o seis operaciones de labranza. El horizonte superficial del suelo se voltea, y se pulveriza por el exceso de labor que generalmente se hace [7]; lo cual provoca disminución en el contenido de materia orgánica y degradación de las propiedades físicas [8]. Por esta razón, el uso de los sistemas de labranza más conservadores ha incrementado enormemente en las últimas décadas.

Dentro de las prácticas de manejo conservacionistas se encuentra la Siembra Directa (SD), también conocida como Labranza Cero, que produce menos disturbio en el suelo que la labranza convencional. La rápida expansión en todo el mundo del área bajo SD, de 45 millones de hectáreas en 1999 a 157 millones de hectáreas en 2013 [9], muestra el creciente interés que esta tecnología está teniendo entre los agricultores. En Argentina, a partir de los años '90, las superficies con SD fueron en ascenso, llegando a abarcar el 91% del área de cultivo (más de 33 millones de hectáreas) en la campaña 2016/17 (**Figura 1.1**) [10].

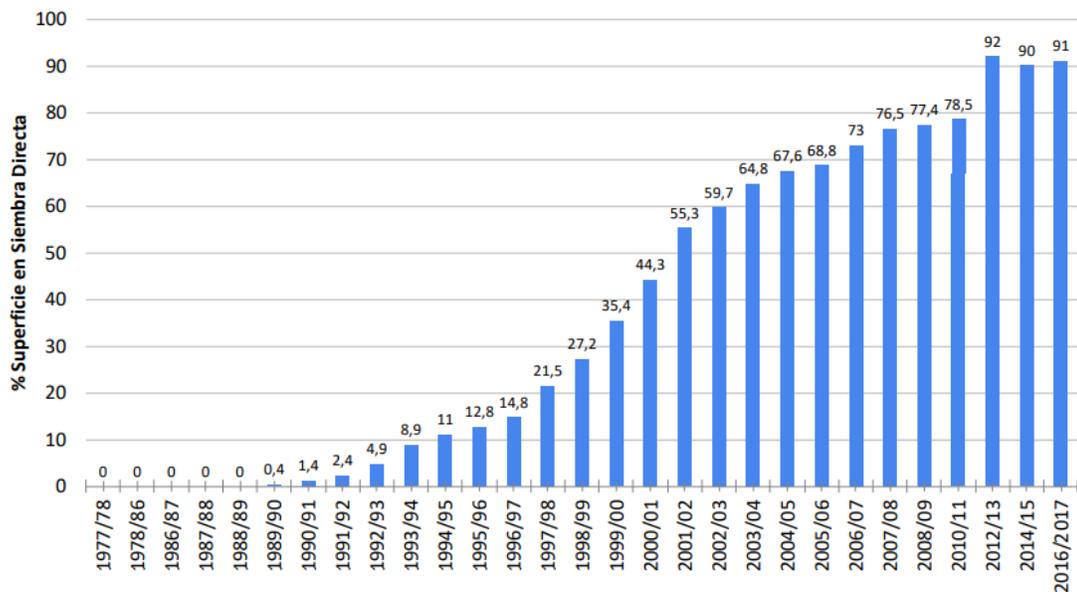
La SD se basa en la incorporación de la semilla en el suelo a la profundidad requerida, con una alteración mínima de la estructura del suelo. Las máquinas agrícolas especialmente diseñadas eliminan la necesidad de arar y minimizan el laboreo requerido para la siembra [11]. Para que este sistema funcione adecuadamente, se requiere que el suelo tenga unas excelentes condiciones físicas y que se haga un estricto control de malezas que generalmente se lleva a cabo con herbicidas [7].

Los beneficios de la adopción de la SD pueden ser medidos en varios aspectos y todos confluyen en un sistema productivo más sustentable. Este sistema mejora el aprovechamiento del agua y el balance de la Materia Orgánica (MO); protege contra la erosión; disminuye la formación de costras superficiales; y aumenta la posibilidad de siembra y los rendimientos. Por lo tanto, la SD favorece la sustentabilidad de los agroecosistemas mediante el incremento de la calidad del suelo, mejorando su estructura y

a)



b)



**Figura 1.1** Evolución de la superficie bajo SD, en Argentina desde 1977 hasta 2017. (a) Superficie en hectáreas, (b) Superficie en porcentaje [10].

renovando el nivel de nutrientes, e incrementando el número y las actividades de las poblaciones microbianas [12].

La intensificación de las prácticas agrícolas bajo laboreo genera reducciones en el contenido de materia orgánica (MO), en el tamaño y la estabilidad de los agregados y pérdidas en la capacidad de captación y aprovechamiento del agua [13]. En SD, la eliminación de la labranza y la retención de rastrojo aumenta el fósforo extraíble en la superficie del suelo, y la fertilización nitrogenada reduce el pH del suelo superficial, pero puede presentarse acumulación y lixiviación de N-nitrato en el perfil del suelo [14]. En general, se afirma que bajo SD los cambios sobre el suelo pueden ser de mayor magnitud en regiones con menor cantidad de precipitaciones debido al efecto de la cobertura sobre la capacidad de retención de agua, particularmente en climas de alta estacionalidad [15].

Una de las principales consecuencias del uso intensivo del suelo es la compactación debido a los animales o el tráfico de maquinaria. La compactación del suelo se puede definir como "el proceso por el cual los agregados del suelo se reorganizan para disminuir el espacio vacío y ponerlos en contacto cercano uno con el otro, que tiene como consecuencia el aumento de la densidad aparente". Por lo tanto, la compactación del suelo implica cambios en las propiedades físicas del suelo (densidad aparente y porosidad) y estos parámetros físicos modificados son determinantes en la influencia de la compactación sobre las propiedades químicas, la biota y su diversidad y el crecimiento de la planta. La compactación en tierras cultivadas afecta sobre todo al horizonte superior del suelo, pero también se observa a cierta profundidad [1]. Algunos estudios en la región semiárida pampeana indican que el efecto de corto plazo (en el ciclo de crecimiento de un verdeo invernal) del pisoteo animal tiene implicancias en las capas más superficiales del suelo, disminuyendo la cantidad de macroporos, que son los encargados de conducir el agua de lluvia hacia las capas más profundas del suelo, y que dicha pérdida es más importante en LC que en SD, mostrando éste último sistema una mayor estabilidad en la distribución del espacio poroso, al ser sometido al pastoreo animal directo [16].

La susceptibilidad de los suelos agrícolas a la compactación varía con la textura del suelo [1] y conduce, en muchos casos, a una disminución del rendimiento del cultivo como resultado de los efectos sobre el crecimiento de plantas y el movimiento del agua a través del suelo. Por ejemplo, en suelos de la región pampeana semiárida susceptibles a este

proceso, el uso intensivo del suelo bajo diferentes sistemas de manejo, provoca la disminución en el contenido de materia orgánica, y resulta en la estructura maciza del suelo [17]. Esta situación afecta la concentración de dióxido de carbono y la mineralización del carbono y nitrógeno orgánico del suelo. Asimismo, favorece las condiciones anaeróbicas del suelo, por lo que la desnitrificación aumenta con la compactación, lo cual puede resultar en un incremento de la emisión de óxido nitroso ( $N_2O$ ) a la atmósfera ante la ausencia de microorganismos reductores de  $N_2O$ . A su vez, estas emisiones aumentan cuando se incorporan fertilizantes nitrogenados bajo condiciones de humedad [1].

La compactación del suelo causada por el pastoreo de animales es probable que sea más generalizada dentro de las parcelas, en comparación con la compactación del suelo causada por las maquinarias que se limita a los surcos. El deterioro físico por el pastoreo animal depende de la intensidad de pisoteo, la humedad del suelo, la cubierta vegetal, pendiente del terreno y el tipo de uso de la tierra. La compactación causada por el animal puede variar de 5 a 20 cm y podría afectar a la mayor densidad de volumen del suelo, conductividad hidráulica, macroporos, y resistencia a la penetración [1]. La intensidad de pastoreo a largo plazo es un factor importante en la regulación de la transformación del nitrógeno (N). Sin embargo, el contenido de humedad y temperatura del suelo desempeñan un papel mayor en la transformación de N; y es importante considerar que el pastoreo intensivo puede reducir la productividad y el almacenamiento de N [18].

El nitrógeno, es generalmente reconocido como el nutriente más limitante requerido por las plantas. Optimizar la eficiencia del uso del N ajustando su ciclo es un objetivo fundamental de la agricultura sostenible. El logro de este objetivo mejorará el rendimiento económico de los agroecosistemas mediante una mejor adecuación de las entradas de N con las necesidades de los cultivos y reduciendo los impactos ambientales negativos de las aplicaciones excesivas de N. Las dinámicas del C y N orgánico del suelo están estrechamente vinculadas en los agroecosistemas [19]. Por lo tanto, los fertilizantes nitrogenados tienen que ser gestionados adecuadamente para evitar pérdidas por volatilización, desnitrificación y lixiviación [20]; y a través de las prácticas de manejo que acumulan materia orgánica, aumentar la capacidad del suelo para satisfacer las necesidades de N del cultivo a través de la mineralización del N orgánico del suelo [19].

Por otra parte, la rotación de cultivos, que involucra la alternancia temporal de diferentes plantas con disímiles requerimientos nutritivos en el mismo espacio, tiene varios efectos positivos en el sistema productivo. Desde el punto de vista de la fertilidad del suelo, la rotación hace un uso balanceado de nutrientes comparado con el monocultivo, evitando desequilibrios químicos de importancia, aunque se complementa con fertilización química que contemple las diferentes necesidades de cada cultivo. Desde el punto de vista de las condiciones físicas del suelo, las rotaciones favorecen su estructura, pues distintos sistemas radiculares de los cultivos exploran diferentes estratos del perfil, permitiendo la colonización del suelo con raíces de diferente arquitectura. Finalmente, tan importante es esta práctica para la sanidad de los cultivos, que su efecto sobre los microorganismos del suelo es explícitamente reconocido como “efecto rotación de los cultivos”, siendo la herramienta de manejo de enfermedades más importante en el mundo [21].

### **Sistemas de manejo a largo plazo**

La actividad agropecuaria modifica el ambiente natural, ya que produce cambios tanto en el suelo, como en la vegetación y su relación con el resto de los organismos. Es en el suelo donde los cambios son más complejos y sus efectos se manifiestan en el corto, mediano y largo plazo.

Los cambios rápidos son fáciles de detectar, se pueden estudiar de manera más simple y sus efectos pueden llegar a atenuarse con prácticas correctivas. Sin embargo, los efectos a largo plazo son mucho más difíciles de detectar, ya que son pequeños cambios que suceden casi imperceptiblemente y se ven con el paso de los años. Son mucho más difíciles de estudiar porque requieren muchos años de monitoreo y evaluación, bajo condiciones que no siempre son las mismas, ya que los sistemas productivos van evolucionando.

Los experimentos a largo plazo permiten observaciones sobre los cambios en los patrones de crecimiento de los cultivos y los efectos sobre factores de cambio lento, como la materia orgánica del suelo, que no se puede hacer de otro modo [2]. Estos estudios proporcionan una manera eficaz de determinar las mejores prácticas de gestión para una fertilidad del suelo, calidad y productividad, sustentable.

### 1.1.2 Efectos de los sistemas de manejo sobre las comunidades microbianas

El manejo de los suelos puede tener un gran impacto sobre la composición y actividad de las comunidades microbianas del suelo, en consecuencia existe preocupación sobre el uso responsable y mantenimiento de la diversidad microbiana de los suelos agrícolas para un manejo sustentable del agroecosistema.

El manejo del cultivo tiene un efecto directo sobre las comunidades microbianas del suelo, lo que afecta la productividad del suelo y la sostenibilidad. La productividad y la salud de los sistemas agrícolas dependen en gran medida de los procesos funcionales llevados a cabo por los microorganismos del suelo, tales como el ciclado de nutrientes y la descomposición de los residuos, así como de los componentes estructurales del suelo, afectando claramente el crecimiento y la calidad del cultivo final. Como es bien sabido, el funcionamiento de los ecosistemas se rige en gran medida por la dinámica microbiana del suelo, siendo las comunidades microbianas afectadas por las prácticas de producción, tales como sistema de manejo [22, 23].

Aunque la biomasa microbiana comprende sólo una pequeña porción del C orgánico total del suelo, cumple un rol muy importante como reservorio de nutrientes para las plantas. Esto se debe a que es mucho más lábil que la materia orgánica total del suelo. Además, las mediciones de la biomasa microbiana pueden revelar posibles cambios en el contenido de materia orgánica, que se producen como resultado del manejo del suelo, mucho antes de que puedan ser detectados por cambios en el C orgánico total del suelo [8]. Estudios sobre el efecto de las prácticas de labranza y la rotación de cultivos bajo labranza cero sobre la diversidad microbiana, parecen indicar que la misma está más afectada por los cambios en la productividad del cultivo y la calidad del residuo de cultivo, que por la labranza [24].

La adopción de prácticas conservacionistas para controlar la degradación del suelo tiene un efecto importante sobre los procesos microbianos involucrados en la dinámica del nitrógeno en el suelo. La liberación del nitrógeno es menor ya que no hay una ruptura tan intensa de los agregados, ni una exposición al aire de la materia orgánica tan marcada, con lo que se ve reducida la tasa de mineralización del nitrógeno del suelo.

Por otro lado, el hecho de que los rastrojos no estén completamente incorporados en el suelo, hace que las tasas de su descomposición sean más bajas y que el efecto de

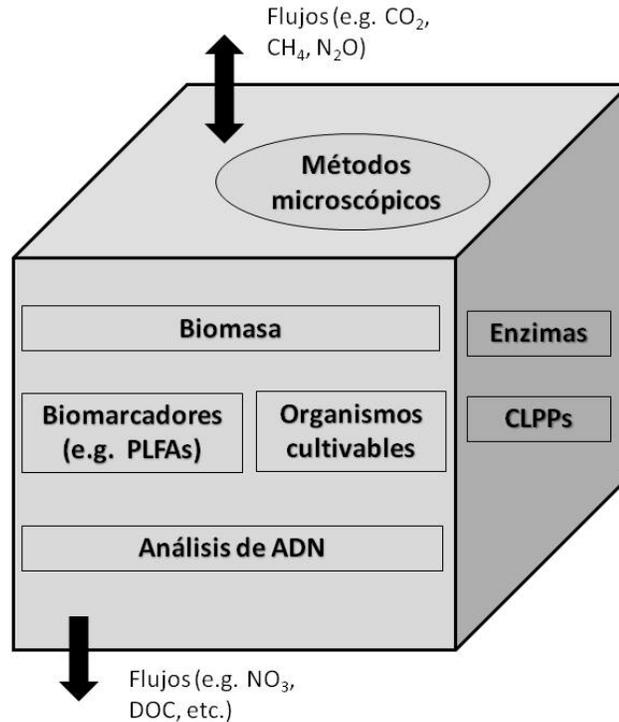
inmovilización del nitrógeno se mantenga por más tiempo. La consecuencia del efecto de las labranzas conservacionistas sobre estos dos procesos es que habrá menos nitrógeno disponible para los cultivos y, en general, habrá que aplicar mayor cantidad de fertilizante.

La densidad y porosidad modificadas por la compactación del suelo, determinan el efecto de la compactación sobre las propiedades físicas y químicas, y en última instancia, de la biota del suelo. El efecto de la compactación sobre la biodiversidad dependerá de la naturaleza del suelo, el clima, y la extensión de la compactación. La biomasa microbiana del suelo puede verse afectada por la compactación, debido a la disminución de la porosidad, lo que conduce a la reducción del C y N de la biomasa microbiana. Además cualquier perturbación o estrés en el suelo pueden influir en las actividades enzimáticas; y las condiciones anóxicas en el suelo pueden inducir cambios en la comunidad microbiana, y favorecer a los organismos capaces de tolerar estas condiciones [1].

Por último, la rotación de cultivos tiene un efecto positivo sobre las poblaciones microbianas, aumentando su diversidad en el suelo. Esto se debe a que la presencia de diferentes cultivos a lo largo del tiempo proporciona mayor variedad de nutrientes al suelo favoreciendo el desarrollo de comunidades microbianas más diversas, lo que contribuye a mejorar el crecimiento de las plantas en ese suelo [21]. Los microorganismos son controlados por el flujo de C y N a través de los residuos de cultivo [25], es decir que según los cultivos que se alternen en la rotación se determinará el tamaño, la diversidad y las actividades de los microorganismos en el suelo, dependiendo del tipo y cantidad de residuos que sean incorporados al sistema.

## 1.2. Evaluación microbiológica del suelo

La ecología microbiana, y más específicamente la microbiología del suelo, es una subdisciplina dinámica y creciente de la ciencia del suelo. Desde hace décadas, la microbiología edáfica ha sufrido cambios en la metodología y enfoque de estudio; y por lo tanto los microbiólogos han abierto nuevas ventanas a la “caja negra” del suelo (**Figura 1.2**) [26].



**Figura 1.2** La caja negra del suelo. Los microbiólogos del suelo abrieron nuevas ventanas para investigar las comunidades microbianas del suelo, su composición y funciones. *PLFA*, ácidos grasos fosfolipídicos; *CLPP*, perfil fisiológico de la comunidad [26].

### 1.2.1 Planes para estudiar los microorganismos del suelo

Es posible medir diferentes aspectos de la presencia y actividad de microorganismos en el ecosistema suelo. El suelo es un sistema biológico complejo y dinámico, que parece caracterizarse por una redundancia de funciones. En general, la reducción de cualquier grupo de especies tiene poco efecto sobre los procesos globales en el suelo debido a que otros microorganismos pueden asumir su función [27]. La microbiota edáfica ha sido caracterizada tradicionalmente con enfoques fisiológicos (actividad y función de los microorganismos), pero en años recientes, se han desarrollado métodos basados en la aplicación de técnicas de biología molecular, lo que ha contribuido enormemente al conocimiento de la estructura y función de las comunidades microbianas.

## Enzimas

Las enzimas en el suelo pueden ser extra- o intracelulares. Las primeras son necesarias para la ruptura de macromoléculas orgánicas, como la celulosa, hemicelulosa o lignina; mientras que las enzimas intracelulares son responsables de la ruptura de moléculas más pequeñas como azúcares o aminoácidos. Las enzimas del suelo son predominantemente de origen microbiano y están estrechamente relacionadas con la abundancia y / o actividad microbiana [28].

El perfil fisiológico a nivel de comunidad (Community Level Physiological Profiling o CLPP) propuesto por Garland y Mills [29], es otro tipo de "ensayo enzimático". Con este método, se prueba en un solo ensayo la capacidad de las comunidades microbianas para degradar un conjunto de hasta 95 sustratos diferentes. Un indicador redox en las placas de microtitulación Biolog<sup>MR</sup> indica si el sustrato específico se utiliza como fuente de energía. Este método es rápido, altamente reproducible, relativamente barato, permite diferenciar comunidades microbianas, genera gran cantidad de datos y es adaptable a placas para bacterias u hongos específicos. Sin embargo, solo representa la fracción cultivable de la comunidad y favorece a los organismos de rápido crecimiento [30].

Los ensayos enzimáticos del suelo, incluyendo CLPPs, nunca son parámetros independientes. Son herramientas de monitoreo rápido, pero que no pueden dar respuestas sobre la funcionalidad. Para caracterizar el suelo, o para entender las diferencias entre los suelos, son necesarios métodos adicionales, que se describen a continuación.

## Flujos y pools microbianos

Las pruebas enzimáticas no se pueden utilizar para estimar los flujos de materia *in situ* ya que son una estimación de la posibilidad de utilizar un cierto sustrato en condiciones optimizadas. El desprendimiento de dióxido de carbono, es un método tradicional desde los primeros días de la microbiología del suelo y sigue siendo el mejor índice de la actividad metabólica bruta de las poblaciones microbianas [26].

Las mediciones de los flujos de nitrógeno son esenciales para la comprensión de la dinámica de los ecosistemas y la productividad agrícola, ya que el N se produce en los suelos, los océanos y la atmósfera y su ciclado tiene implicancias globales. El nitrógeno es a menudo el factor limitante para la actividad microbiana. Muchos de los métodos

tradicionales, como las pruebas de mineralización de N, nitrificación potencial, o el método de inhibición de acetileno para la desnitrificación siguen siendo ampliamente utilizados.

La biomasa (por ejemplo, la raíz de la planta y biomasa aérea, biomasa de la fauna) y otros grupos orgánicos (residuos, materia orgánica del suelo) son componentes importantes para el funcionamiento de un ecosistema. Un método indirecto de determinación de la biomasa microbiana fue el propuesto por Jenkinson [31], llamado Método de Fumigación e Incubación (F-I), que se basa en la muerte o lisado de células microbianas del suelo con cloroformo, la reinoculación con suelo y la medición de la respiración a los 10 días. En comparación con un control no fumigado, la muestra fumigada muestra una mayor producción de CO<sub>2</sub> que se atribuye al C de la biomasa microbiana que ha sido destruida y posteriormente degradada.

Otro enfoque fisiológico, propuesto por Anderson y Domsch [32], es el método de la respiración inducida por sustrato (SIR). Se adiciona glucosa como sustrato fácilmente disponible al suelo, y los microorganismos responden en forma inmediata en la respiración, que se supone está linealmente correlacionada con la biomasa de C.

Los tamaños de los pools microbianos han demostrado ser indicadores fiables de la calidad del suelo, y contribuyen a la comprensión de la dinámica de los nutrientes, tanto a largo plazo como estacionalmente. La biomasa microbiana es un parámetro robusto que puede determinarse rápidamente, y de forma reproducible. Además permite comparaciones brutas de los suelos, y puede reflejar cambios por el manejo de los suelos, o el impacto de la contaminación [26].

## **Biomarcadores**

Un gran avance en el uso de biomarcadores para la caracterización de la comunidad fueron los ácidos grasos de fosfolípidos (Phospholipid fatty acids o PLFA), que se encuentran en las membranas de todas las células vivas y que pueden utilizarse para la determinación de la composición de la comunidad [33, 34]. Los grupos bacterianos y hongos pueden ser caracterizados de acuerdo con su composición de lípidos. Todos los biomarcadores tienen en común el problema de extracción y estabilidad desconocida en el suelo. Por lo tanto, no es fácil juzgar si los datos derivados de los biomarcadores están relacionados con las células vivas solamente, o si también incluyen material celular muerto.

La estabilidad de los biomarcadores en el suelo depende en gran medida de la temperatura, la humedad y otras condiciones directamente relacionadas con los procesos de degradación. A pesar de esto, la búsqueda de biomarcadores confiables sigue siendo una herramienta aceptable y vigente; entre ellos, también los que se obtienen mediante métodos moleculares.

### **Microbiología del suelo y ADN**

Los métodos moleculares proveen valiosa información acerca de las comunidades microbianas, en contraposición de las técnicas basadas en cultivo [30]. Generalmente involucran la extracción de ADN del suelo directa o indirectamente. Son técnicas independientes de cultivo, y de acuerdo a su sensibilidad pueden detectar especies, géneros, familias o aún grupos taxonómicos superiores [27].

Los ecólogos moleculares del suelo utilizan la característica única del 16S ADNr procariota que contiene las regiones conservadas y variables. El 16S ADNr es una cadena de aproximadamente 1500 pares de bases nucleotídicas (pb). Las regiones conservadas se desvían sólo entre los grupos taxonómicamente distantes, mientras que las regiones variables pueden mostrar diferencias incluso entre diferentes cepas de una sola especie [26].

Varios métodos se utilizan hoy en día para estudiar el ADN o ARN del suelo. Los métodos de baja resolución, brindan un panorama general de la composición de la comunidad microbiana luego de estrés o cambios en el manejo; mientras que las técnicas de alta resolución, permiten la detección de cepas microbianas al nivel de especie o subespecie. Sin embargo, la mayoría de los métodos moleculares tienen un nivel de resolución intermedio, ya que permiten la detección de grupos microbianos más que de especies [27].

#### **1.2.2 Limitaciones en los estudios de diversidad microbiana**

Es difícil determinar la composición de las comunidades microbianas del suelo, dada su complejidad y dinamismo. Además, existen limitaciones en la determinación de las reacciones mediadas por microorganismos, ya que los ensayos presentes para la

determinación de la tasa general de procesos metabólicos o actividades enzimáticas específicas, no permiten la identificación de las especies microbianas que participan directamente en los procesos de medición. El problema central que plantea la relación entre la diversidad microbiana y la función del suelo, es entender las relaciones entre la diversidad genética y la estructura de la comunidad, y entre la estructura y función de la comunidad. Una mejor comprensión de las relaciones entre la diversidad microbiana y las funciones del suelo no sólo requiere el uso de ensayos más precisos para caracterizar taxonómicamente y funcionalmente el ADN y ARN extraído de suelo, sino también las técnicas de alta resolución con las cuáles detectar células microbianas inactivas y activas en la matriz del suelo [35].

Además de las restricciones metodológicas, existe en el suelo una heterogeneidad innata, y por lo tanto una distribución espacial de los microorganismos. Por lo tanto, otro problema en la microbiología del suelo son los muestreos, debido a la complejidad del medio que se muestrea. Deben determinarse qué horizontes del suelo se van a muestrear, el número de muestras a tomar (para estimar la variabilidad), exactamente dónde tomar las muestras (para determinar la variación espacial), la frecuencia con la que se tomarán las muestras (para determinar la variación temporal) y el tamaño de las mismas. Estos son a menudo problemas interrelacionados, por ejemplo una muestra compuesta subdividida en muestras pequeñas es diferente a muchas muestras pequeñas independientes. Por otra parte, mientras que las determinaciones *in situ* se prefieren para estudios de ecosistemas, los estudios *in vitro* han demostrado ser suficiente para otros fines, como los estudios de descomposición o de caracterización más general del suelo.

### 1.3. Comunidades microbianas en el metabolismo del nitrógeno

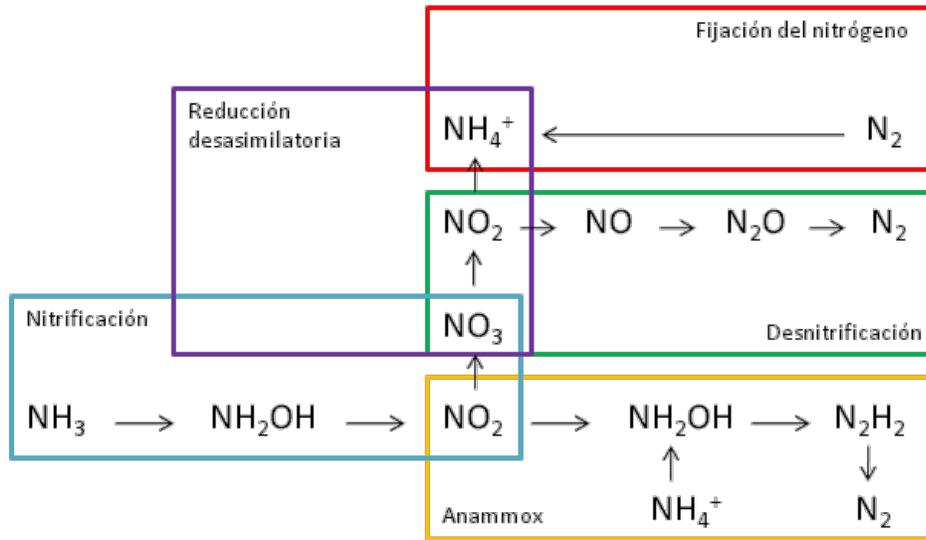
Los microorganismos del suelo son de importancia extrema para el buen funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas. En particular, un número de grupos funcionales microbianos, además de las plantas, son responsables en el ciclado del nitrógeno (N). Las bacterias fijadoras de nitrógeno, nitrificantes y desnitrificantes determinan en gran medida

la disponibilidad de N en el suelo, y las pérdidas de N por lixiviación de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) o emisiones gaseosas de N [36].

### 1.3.1 El ciclo biológico del nitrógeno

En la naturaleza, el nitrógeno está presente en diferentes formas de oxidación que van desde compuesto reducidos, como el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), a compuestos totalmente oxidados como el  $\text{NO}_3^-$ . La conversión entre estas diferentes formas de N está primordialmente mediada por microorganismos (**Figura 1.3**). El principal reservorio de nitrógeno se encuentra en la atmósfera como nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ). Puede ser convertido a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) por procariotas simbioses así como por procariotas de vida libre, en un proceso llamado *Fijación Biológica del Nitrógeno* (FBN). El  $\text{NH}_3$  puede ser oxidado a  $\text{NO}_3^-$  durante un proceso que tiene dos pasos, llamado *Nitrificación*. El  $\text{NO}_3^-$  producido puede ser reducido tanto a gas  $\text{N}_2$  vía *Desnitrificación*, como a  $\text{NH}_4^+$  por *Reducción Desasimilatoria del Nitrato*. Estos pasos forman las principales partes del ciclo del nitrógeno inorgánico en el suelo [37]. Además, se ha mostrado que ocurren en ciertos ambientes otras reacciones, como la *Oxidación de Amonio Anaeróbica* (Anammox), donde el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) es reducido a gas dinitrógeno usando el amonio como donante de electrones inorgánico. Sin embargo, no se ha probado aún que Anammox tenga un rol importante en el ecosistema del suelo [38]. El amonio y el nitrato pueden ser usados por la mayoría de las células vivas para producir formas orgánicas de nitrógeno, como proteínas, las cuales son esenciales para la vida. Durante la descomposición de la biomasa (plantas, animales, hongos, bacterias), estas formas de nitrógeno orgánicas son hidrolizadas y se libera amoníaco, proceso conocido como *Amonificación o Mineralización del Nitrógeno*. Por lo tanto, el amoníaco es la unión entre el ciclo del nitrógeno orgánico e inorgánico. Todos estos procesos forman el ciclo global del nitrógeno y los microorganismos son esenciales para mantener el balance entre las formas reducidas y oxidadas del nitrógeno.

En muchos ecosistemas del suelo, el nitrógeno es a menudo un nutriente limitante para el crecimiento de las plantas porque se pierde continuamente por desnitrificación, erosión del suelo, lixiviado, y volatilización del amonio. Las pérdidas de nitrógeno a través de la volatilización del amonio y la desnitrificación son factores significativos de considerar cuando se desarrollan estrategias de manejo del nitrógeno en sistemas de cultivos agrícolas.



**Figura 1.3** Procesos microbianos que contribuyen al ciclo biológico del nitrógeno [39].

### 1.3.2 Nitrificación

Algunos de los amonios producidos en la mineralización del N pueden ser tomados por las plantas o microorganismos, y una menor cantidad puede ser volatilizada, pero por lo general la mayor parte se nitrifica a nitrato por bacterias del suelo, siempre que las condiciones sean aeróbicas [40].

La nitrificación es un proceso de dos etapas, que consiste en la conversión de amoníaco a nitrito, que es a su vez convertido a nitrato. Estos pasos se llevan a cabo por dos grupos diferentes de organismos, oxidadores de amoníaco y oxidadores de nitrito (AOB y NOB), respectivamente. Aunque se conocen unas pocas especies de bacterias heterótrofas nitrificantes, la vasta mayoría son procariontes aerobios quimiolitotróficos que tienen la capacidad de usar amonio como única fuente de energía y  $CO_2$  como fuente de carbono (C) [41]. Bacterias del género *Nitrosomonas* son en gran parte responsables de la oxidación de amonio a nitrito, y *Nitrobacter* spp. de la oxidación de nitrito a nitrato [40]. Estas bacterias representan una pequeña proporción del total de la biomasa microbiana en el suelo, pero debido a su sensibilidad, así como a su importancia en el ciclo del nitrógeno, las AOB han sido frecuentemente usadas como organismos indicadores de disturbios causados, por ejemplo, por herbicidas y metales, o por efectos debido a las prácticas agrícolas [42].

En la nitrificación, el paso limitante es la oxidación de amonio a nitrito [43]. En los suelos, este paso es mediado por bacterias y arqueas oxidantes del amonio (AOB y AOA, respectivamente) [44]. En las AOB y AOA, el amonio primero es oxidado por la enzima de membrana amonio-monooxigenasa (AMO). Los genes que codifican para esta enzima forman parte del operón *amoCAB*. En particular, la porción *amoA* ha sido extensamente estudiada como biomarcador para estudiar la diversidad de las AOB [41, 45]. Además, cambios en el número de microorganismos oxidantes del amonio (AOM) y composición de especies han sido postulados como indicadores *in situ* del impacto biológico de los contaminantes y como punto final en la recuperación de ambientes contaminados [46], ya que son especialmente sensibles a metales pesados (Zn) [47], herbicidas [48, 49], fungicidas [50] e hidrocarburos [51].

### 1.3.3 Desnitrificación

La desnitrificación microbiana es un proceso respiratorio en el que el nitrato o nitrito se reduce a óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) o gas nitrógeno (N<sub>2</sub>). Estos óxidos de nitrógeno se utilizan como aceptores de electrones en lugar de oxígeno para la generación de un potencial electroquímico transmembrana de protones a través de la membrana citoplasmática.

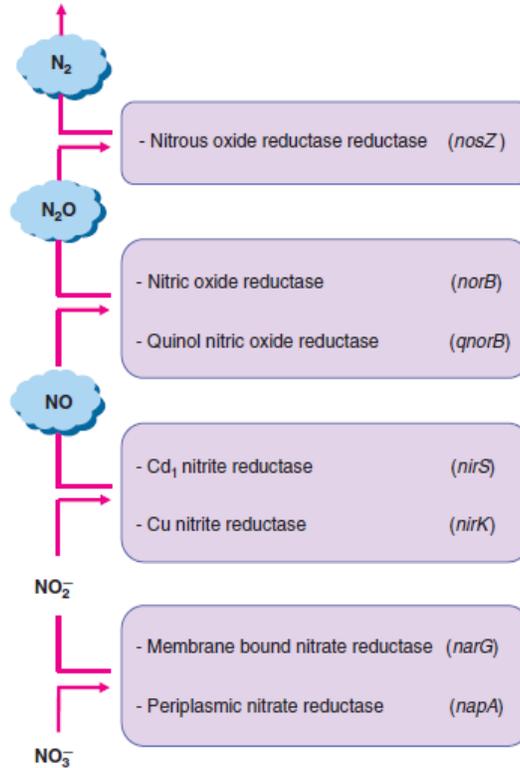
Las fuentes de energía de las bacterias desnitrificantes incluyen tanto compuestos orgánicos e inorgánicos, así como luz, aunque los sustratos orgánicos son los más comunes [39]. El proceso se debe principalmente a las enzimas bacterianas, que catalizan la secuencia de reacciones. El grado de desnitrificación depende de la cantidad de nitrato en la solución del suelo, y del oxígeno disponible para los microorganismos que limita las condiciones anaeróbicas del suelo [40].

### **Enzimología de la desnitrificación**

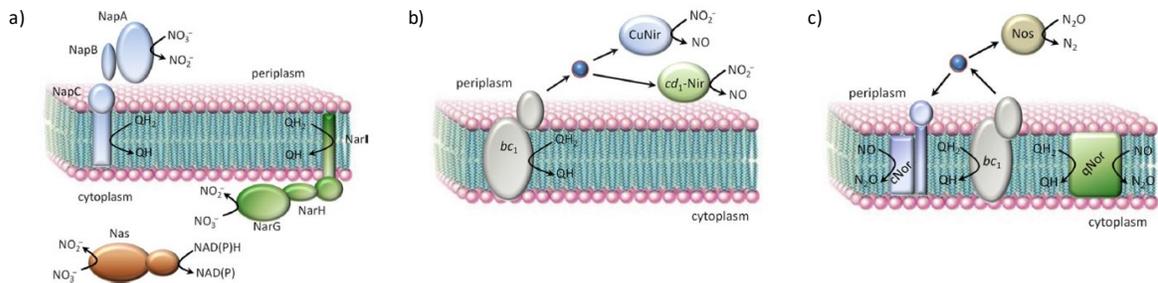
En la desnitrificación la reducción de nitratos es el primer paso del proceso, se reduce el nitrato a óxidos de nitrógeno gaseosos, y luego a gas nitrógeno. La producción de N<sub>2</sub> conecta la desnitrificación con el ciclo del nitrógeno a través de la fijación de nitrógeno. Mientras el N<sub>2</sub> es el producto terminal de la vía, es importante tener en cuenta que no todas

las bacterias tienen las cuatro enzimas de la desnitrificación; muchas bacterias han truncado la vía, y a veces tienen solo una sola enzima [52]. Por lo tanto, la desnitrificación es completa cuando el microorganismo desnitrificante contiene el juego completo de genes de la desnitrificación (*nar/nap*, *nir*, *nor* y *nos*), e incompleta cuando al organismo le faltan uno o varios de estos genes y por lo tanto, es incapaz de reducir alguno de los óxidos de N que intervienen en el proceso [37, 53].

Los estudios genéticos y bioquímicos han conducido a la identificación de siete enzimas que catalizan los cuatro pasos de la vía de desnitrificación (**Figura 1.4**). El primer paso de este proceso secuencial es la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , que se lleva a cabo por las bacterias que tienen uno de los dos tipos de nitrato reductasa: la nitrato reductasa unida a la membrana (Nar) o nitrato reductasa periplásmica (Nap). El segundo paso de la vía de desnitrificación, es la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a NO, es la etapa clave, ya que los óxidos de nitrógeno solubles se reducen a gas. Esta reacción distingue desnitrificantes de reductores de nitrato y es catalizada por una nitrito reductasa homotrimérica de cobre (NirK) o por una nitrito reductasa homodimérica citocromo cd1 (NirS) [37]. En general, los desnitrificantes poseen sólo uno de los dos tipos de nitrito reductasa. Las dos enzimas son funcionalmente y fisiológicamente equivalentes. El siguiente paso de la vía es la reducción del NO, producto intermediario tóxico, y se lleva a cabo por dos tipos de enzimas. Una recibe los electrones del citocromo *c* o pseudoazurin (cNor) y la otra de una fuente de quinol (qNor). Su ausencia es letal para el organismo desnitrificador ya que el óxido nítrico se acumularía alcanzando niveles tóxicos [54]. Se ha revelado mediante secuenciación del genoma, la existencia de las enzimas Nir y Nor en organismos no desnitrificantes. Esto indicaría la existencia de un amplio espectro fisiológico de estas enzimas, no solo para el metabolismo anaeróbico sino también para la detoxificación celular [55]. Finalmente, el último paso de la vía de desnitrificación, la reducción del gas de efecto invernadero  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ , es catalizado por la óxido nitroso reductasa multicobre homodimérica (Nos) situada en el periplasma. La disposición básica de algunas de las reductasas se muestra en la **Figura 1.5**. La ubicación periplásmica de varias de las reductasas de óxidos de N, así como el hecho de que ninguna de estas enzimas son bombas de protones, hace que la desnitrificación sea una forma bastante ineficiente de respiración [52].



**Figura 1.4** Cascada de la desnitrificación con las diferentes enzimas reductasas y el nombre de los genes que codifican las correspondientes subunidades catalíticas (en paréntesis) [56].



**Figura 1.5** Arreglo básico de las reductasas y pasos en la transferencia de electrones de Nitrato reductasas (a), Nitrito reductasas (b) y Óxido nítrico reductasa y Óxido nitroso reductasa (c) (compilado de Shapleigh [52]).

En la mayoría de las bacterias desnitrificantes, la expresión de los genes que codifican estas proteínas depende de la presencia de óxidos de nitrógeno. Por lo tanto, es natural describir los genes de desnitrificación como parte de un “stimulon”, un término que se refiere a operones que responden juntos a un estímulo ambiental en particular. En general, Nir y Nor son parte de un “NO stimulon” y Nos es parte de un “N<sub>2</sub>O stimulon” [57–59]. Mientras que los genes de desnitrificación pueden ser comunes en la mayoría de los entornos, en los suelos se reconoce cada vez más que la desnitrificación es “irregular”. Ciertos sitios son “puntos calientes” o “hot spots” en relación con otros sitios que están ubicados cercanamente [60, 61], y se definen de esta manera por que representan sitios con altas tasas de desnitrificación. Incluso dentro de este marco, se ha hecho evidente que los sitios pueden tener momentos con mayor actividad, es decir que son también objeto de “momentos calientes” o “hot moments”, y los estudios moleculares han apoyado la idea [62]. La aparición de “hot spots” y “hot moments” hace que sea difícil evaluar con precisión la desnitrificación, sobre todo si consideramos que los estudios se llevan a cabo realizando muestreos en momentos determinados.

### **Factores que afectan la desnitrificación**

La desnitrificación es el principal proceso biológico responsable de devolver nitrógeno fijado a la atmósfera, completando así el ciclo del nitrógeno. Esta reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso es negativa para la agricultura, ya que puede mermar en el suelo el contenido de un nutriente esencial para las plantas y las pérdidas pueden ser considerables. Por otro lado, el uso excesivo de fertilizantes de nitrógeno en la agricultura ha dado lugar a la acumulación de nitratos en el agua subterránea y agua de superficie, y la desnitrificación resulta útil para la eliminación del nitrógeno de estas fuentes contaminadas [39].

Los factores que aumentan la desnitrificación incluyen condiciones de suelo húmedo y cálido, un suministro de MO para descomponer y pH casi neutro. En los suelos en los que la concentración de nitrato es consistentemente baja, como en suelos de pradera que reciben poco o ningún fertilizante nitrogenado y con pocos animales en pastoreo, se produce poca desnitrificación. En sitios manejados más intensamente, de vez en cuando se producen altas concentraciones de nitrato, debido a la aplicación de fertilizantes y / o el retorno del N de la orina, pero la desnitrificación se produce sólo cuando éstas situaciones coinciden con

condiciones anaeróbicas. La mayoría se producen durante períodos cortos cuando las condiciones son especialmente favorables, por lo general a partir de algunas horas después de la aparición de la precipitación, aunque puede producirse alguna desnitrificación durante períodos mucho más largos en zonas localizadas del suelo [40].

Mientras que las prácticas agrícolas de conservación son globalmente beneficiosas para la calidad del suelo, la labranza reducida y la conservación de los residuos pueden provocar efectos secundarios ambientales negativos, como el aumento de las emisiones de  $N_2O$ . La menor disponibilidad de oxígeno y espacio aéreo en los suelos, junto con la descomposición de los residuos de los cultivos en las capas superficiales del suelo, es probable que favorezcan los procesos anaeróbicos tales como la desnitrificación. El aumento de las tasas de desnitrificación es factible que sea mediada también por un aumento de la biomasa desnitrificante. En este contexto, las tasas de desnitrificación en este tipo de sistemas son dignos de atención, ya que este proceso microbiano puede representar una importante fuente de  $N_2O$  que contribuye al calentamiento global y la destrucción de la capa de ozono [63].

### **Criterio para la diferenciación de bacterias reductoras de nitrato y desnitrificantes**

En el capítulo 3 de esta tesis se siguieron dos enfoques para la detección de bacterias desnitrificantes. Por un lado, se determinó la densidad de este y otros grupos bacterianos mediante Número Más Probable en microplaca, y se realizó la prueba de reducción del nitrato según Fadin, que permite diferenciar a las bacterias reductoras de nitrato de las desnitrificantes, por la presencia o ausencia de nitrito [64]. Esta metodología, que se describe en detalle en el capítulo 3, no considera la producción de gas para la confirmación de bacterias desnitrificantes.

Por otra parte, como análisis exploratorio se buscó detectar comunidades bacterianas desnitrificantes a través de genes funcionales, y se tomó como criterio la detección del gen *nosZ* para la confirmación de bacterias desnitrificantes, ya que es el último gen involucrado en el proceso de desnitrificación [53, 56], y en definitiva el que confirma el cierre del ciclo con la producción de  $N_2$ .

## 1.4. Fundamentos del problema. Hipótesis y objetivos generales

Desde el año 1999 se lleva a cabo en la región sudoeste de la provincia de Buenos Aires (EEA INTA Bordenave) un ensayo de sistemas de labranza en sistemas mixtos. El objetivo principal del mismo era evaluar la inserción de la SD en secuencias de cultivo comunes de los sistemas mixtos (especialmente trigo y avena), estudiando su producción física y los efectos sobre parámetros físicos y químicos del suelo, en relación con sistemas de labranza mecánica. La información obtenida desde el punto de vista físico y químico es amplia y se han cubierto los objetivos parciales del tema (ver **Capítulo 2**).

Hasta el momento del comienzo de la presente Tesis, en el ensayo no se habían realizado estudios desde el punto de vista microbiológico, siendo que los microorganismos cumplen un rol fundamental en el agroecosistema. Los microorganismos realizan importantes procesos bioquímicos relacionados a la descomposición de la materia orgánica y reciclaje de nutrientes, entre otros. La presencia y actividad en el suelo de la población microbiana está directamente relacionada con el manejo del suelo y de los cultivos en los agroecosistemas, y de su actividad resultan alteraciones en las propiedades físicas y químicas del suelo, con reflejos en la productividad de los cultivos y en la sustentabilidad del agroecosistema. Además, en suelos argentinos hay escasa información acerca de cómo afectan los sistemas de manejo agrícola al tamaño, la composición y actividad de grupos funcionales microbianos.

Por esto, se decidió llevar a cabo la Tesis enfocando el estudio a determinados grupos microbianos y se plantearon las siguientes **hipótesis del trabajo**:

- ✓ La abundancia y actividad microbiana es menor en suelos que reciben disturbios por labranzas y/o por presencia de animales para pastoreo.
- ✓ La fertilización nitrogenada aumenta la abundancia de los grupos bacterianos nitrificadores, reductores de nitrato y desnitrificadores.
- ✓ El pastoreo por su efecto en la compactación del suelo, favorece los procesos anaeróbicos, y por ende a la abundancia y diversidad de bacterias desnitrificantes.

- ✓ Durante la degradación de rastrojo, la actividad microbiana se ve favorecida por el incremento en el contenido de agua y nitrógeno en el suelo, y se refleja en un aumento en la actividad enzimática microbiana y la biomasa microbiana activa del suelo.

De acuerdo a estas hipótesis, se propuso como **objetivo general** “Analizar variables de la comunidad microbiana en suelos semiáridos del sur-oeste bonaerense (SOB), para establecer el efecto de los manejos agrícolas y evaluar la inserción de la siembra directa en suelos frágiles”.

Específicamente se propuso:

- ✓ Evaluar la abundancia y respiración microbiana en suelos semiáridos del SOB, para determinar si existen cambios en la microbiota por efecto del laboreo, el pastoreo y la fertilización nitrogenada.
- ✓ Aislar y caracterizar cepas de suelos semiáridos del SOB bajo condiciones anaeróbicas, para evaluar si el laboreo y el pastoreo afectan la diversidad de bacterias potencialmente desnitrificadoras.
- ✓ Determinar la respiración inducida por sustrato y actividades enzimáticas durante la degradación del rastrojo, para evaluar si la variación en el contenido de agua y la dosis de fertilizante nitrogenado afectan la actividad microbiana durante este proceso.

## 1.5. Diagramación de la tesis

La presente tesis consta de este capítulo introductorio y cinco (5) capítulos más.

En el *Capítulo 2* se describe el ensayo de labranzas en el cual se realizaron los muestreos, las condiciones físicas y químicas del suelo, las condiciones meteorológicas, y la organización de los muestreos.

Durante tres (3) años consecutivos se tomaron muestras de cada tratamiento evaluado del ensayo, y se evaluó la abundancia (mediante técnicas basadas en el cultivo de microorganismos) y la actividad (medida como respiración) de la microbiota heterotrófica aerobia. De igual forma, se evaluó la abundancia de las comunidades nitrificantes, reductoras de nitrato y desnitrificantes; y posteriormente a modo de análisis exploratorio, se

seleccionaron muestras de suelo bajo diferentes tratamientos y se estudió la presencia y diversidad funcional de las comunidades microbianas nitrificantes y desnitrificantes del suelo, por medio de técnicas basadas en ácidos nucleicos (*Capítulo 3*).

A partir de los resultados del ensayo de campo, se profundizó en dos temas de interés agronómico. Por un lado, se estudiaron cepas potencialmente desnitrificantes debido a su asociación a la fertilización nitrogenada y el pastoreo (*Capítulo 4*). Por otra parte, dado el estrés hídrico al que estaban sometidos los suelos en los primeros años de muestreo, se diseñó un ensayo bajo condiciones controladas de laboratorio para verificar si situaciones contrastantes de humedad afectan los procesos degradativos del rastrojo (*Capítulo 5*).

Finalmente, en el *Capítulo 6* se brindan las principales conclusiones.

# CAPÍTULO 2

## SITIO DE ESTUDIO Y ENSAYO DE LABRANZAS

### 2.1 Sitio de Estudio

#### 2.1.1 Localización

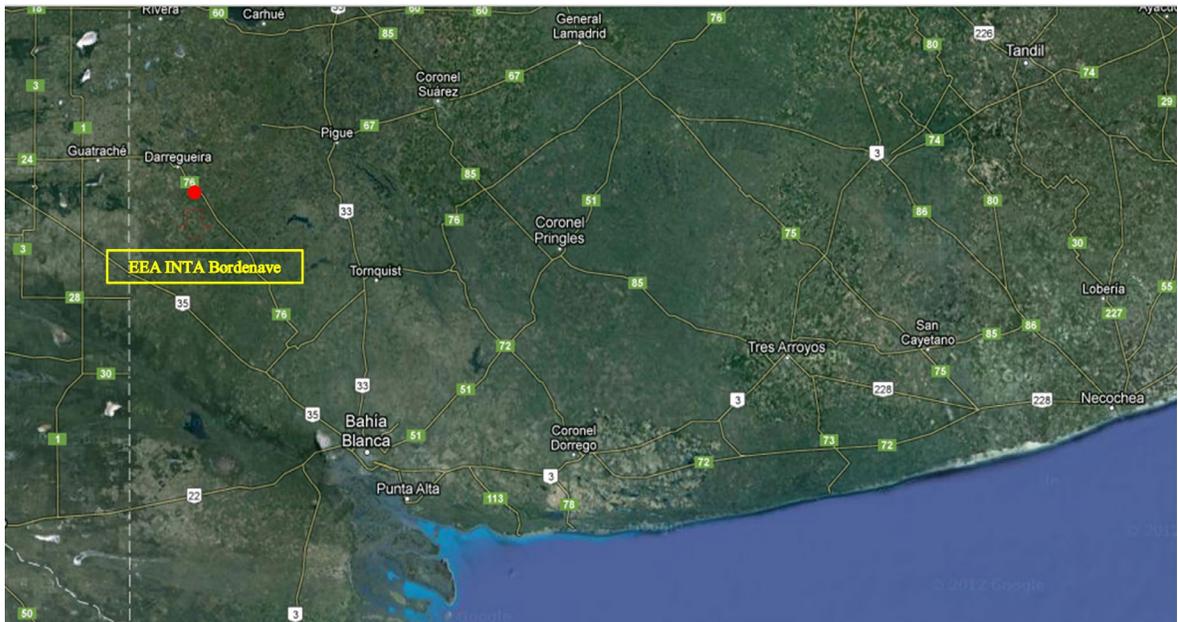
El sitio de estudio fue un ensayo de labranzas a largo plazo llevado a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Bordenave del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) ( $37^{\circ} 45' 47''$  S y  $63^{\circ} 5' 54''$  O) (**Figura 2.1**). La EEA Bordenave está ubicada en el Km 36,5 de la ruta provincial N°76, en la localidad de Bordenave (partido de Puan, provincia de Buenos Aires, Argentina) (**Figura 2.2**). Biogeográficamente se ubica en la región pampeana, más precisamente en la región semiárida del sur-oeste (SO) bonaerense.

#### 2.1.2 Condiciones climáticas

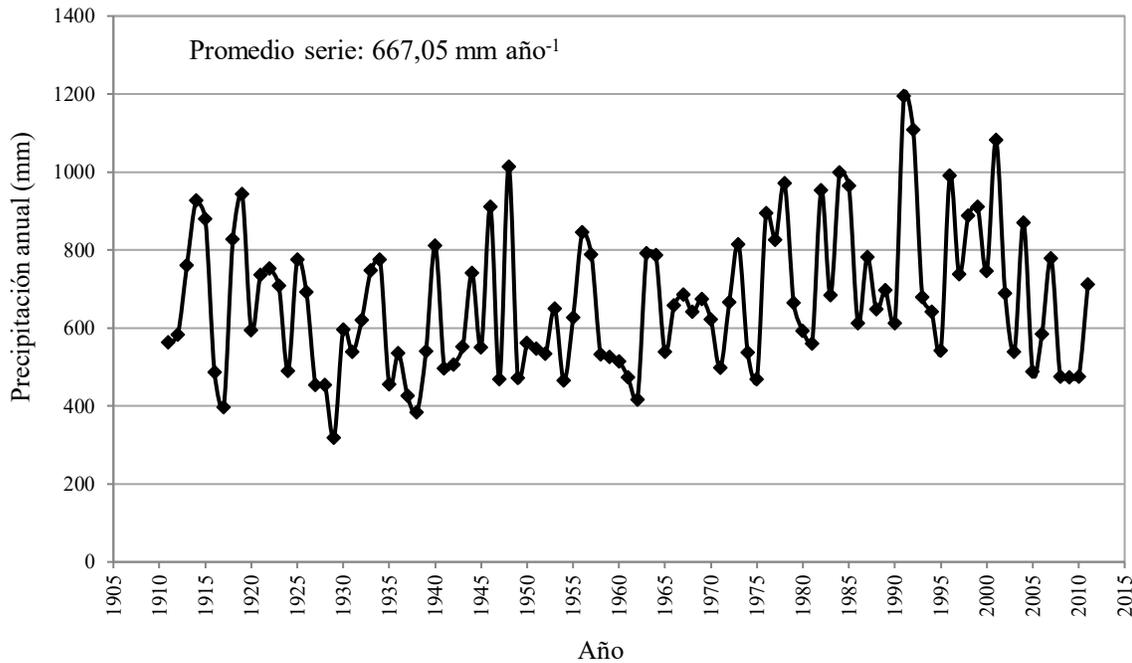
El clima se describe como continental templado, con una temperatura media anual de  $15^{\circ}\text{C}$ . La precipitación media anual es de 667,05 mm (1911-2011) (**Figura 2.3**), concentrada en otoño y primavera; con una estación seca a fines del invierno y otra semiseca a mediados del verano. En ningún momento del año existe exceso de agua en el suelo, resultando la evapotranspiración potencial superior a la oferta climática. El período medio libre de heladas comprende los meses de diciembre, enero y febrero, aunque existe probabilidad de heladas (en valores absolutos) en cualquier momento del año, siendo frecuentes las heladas tardías (octubre y noviembre) (Krüger HR, Comunicación personal; [65]).



**Figura 2.1** Fotografía del sitio de estudio en la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Bordenave.



**Figura 2.2** Localización geográfica del sitio de estudio.



**Figura 2.3** Precipitaciones medias anuales en EEA INTA Bordenave durante el período 1911-2011.

### 2.1.3 Características físicas y químicas

El suelo del sitio de estudio ha sido clasificado como *Haplustol éntico, franca fina, mixta, térmica*, típico de la región, de mediana a baja fertilidad, susceptible a la erosión eólica, y con un horizonte petrocálcico entre 0,7 y 1 m de profundidad. El perfil es de tipo Ap (0-12cm) – B1 (12-25cm) – B2 (25-35cm) – B3 (35-40cm) – C (40-80cm) – IICca (80cm+). La textura es franco-arenosa y la profundidad media al horizonte petrocálcico en el lote alcanza los 90 cm. Las características del horizonte superficial Ap del suelo en el sitio bajo estudio se muestran en la **Tabla 2.1**. Las características físicas y químicas del suelo, fueron provistas por el Dr. Krüger y su equipo de trabajo, quienes además han brindado los parámetros hídricos, estimados a partir de determinaciones de laboratorio y ajustados por los máximos y mínimos valores observados durante el experimento (**Tabla 2.2**).

**Tabla 2.1** Características del horizonte superficial del suelo en el sitio de estudio (COT, Carbono Orgánico Total; P, Fósforo).

Textura	franca
Arena 2,0-0,05 mm (%)	46
Limo 0,05-0,002 mm (%)	35
Arcilla < 0,002 mm (%)	19
COT (g kg <sup>-1</sup> )	17,4
Pextractable (mg kg <sup>-1</sup> )	23,3
pH (agua 1:2,5)	7,5

**Tabla 2.2** Parámetros hídricos en el sitio de estudio (Prof, Profundidad; Hum, Humedad; CC, Capacidad de Campo; PMP, Punto de Marchitez Permanente; DA, Densidad Aparente; CAU, Capacidad de Almacenamiento de agua Útil).

Prof (cm)	Hum en CC (%)	Hum en PMP	DA (Mg m <sup>-3</sup> )	Lámina de agua (mm)		
				en CC	en PMP	CAU
0-20	0,26	0,09	1,20	62,4	21,6	40,8
20-40	0,26	0,09	1,11	57,7	20,0	37,7
40-60	0,26	0,09	1,11	57,7	20,0	37,7
60-80+	0,26	0,09	1,17	60,8	21,1	39,7
Total:				239 mm	83 mm	156

## 2.2 Ensayo de Labranzas

### 2.2.1 Descripción del Ensayo

El ensayo “Sistemas de Labranza en Sistemas Mixtos del Sur-Oeste de la Provincia de Buenos Aires” se lleva a cabo desde el año 1999, y es dirigido por el Dr. Hugo R. Krüger. Está enfocado principalmente a la evaluación de la inserción de la siembra directa en secuencias de cultivos comunes de sistemas mixtos agrícola-ganaderos de la región, estudiando su producción física y los efectos de la incorporación de animales para pastoreo sobre parámetros físicos y químicos del suelo, en relación con sistemas de labranza mecánica. El sistema mixto involucra la incorporación de un cultivo de avena pastoreado por novillos de 350 a 400 kg (25 cabezas ha<sup>-1</sup>) previo al cultivo de trigo.

El diseño experimental original del ensayo consiste en un factorial triple con cuatro (4) bloques divididos en franjas (**Figura 2.4**). La parcela tiene una superficie de 4,5 x 35 m (157,5 m<sup>2</sup>), y la subparcela de 4,5 x 17,5 m (78,75 m<sup>2</sup>).

Los factores aplicados a parcelas transversales a cada bloque son:

- A. *Sistema de labranza* con tres niveles: a) Convencional (LC) (barbecho en base a herramientas de discos); b) Vertical (LV) (discos y cincel); y c) Siembra Directa (SD) (químico).
- B. *Fertilización nitrogenada* con tres niveles: a) 0 (testigo); b) 30 kg de N ha<sup>-1</sup>; y c) 60 kg de N ha<sup>-1</sup>. Se aplica únicamente al cultivo de trigo en forma fraccionada, con 15 kg N ha<sup>-1</sup> localizado a la siembra (fosfato diamónico) y el resto al voleo en macollaje (urea).

Mientras que el tercer factor se aplica a parcelas a lo largo de cada bloque:

- C. *Manejo del verdeo*, representa la condición de utilización del verdeo de invierno y considera dos niveles: Pastoreo directo (Pastoreado, P) y corte del forraje mecánico o utilización como cultivo de cobertura (No Pastoreado, NoP).

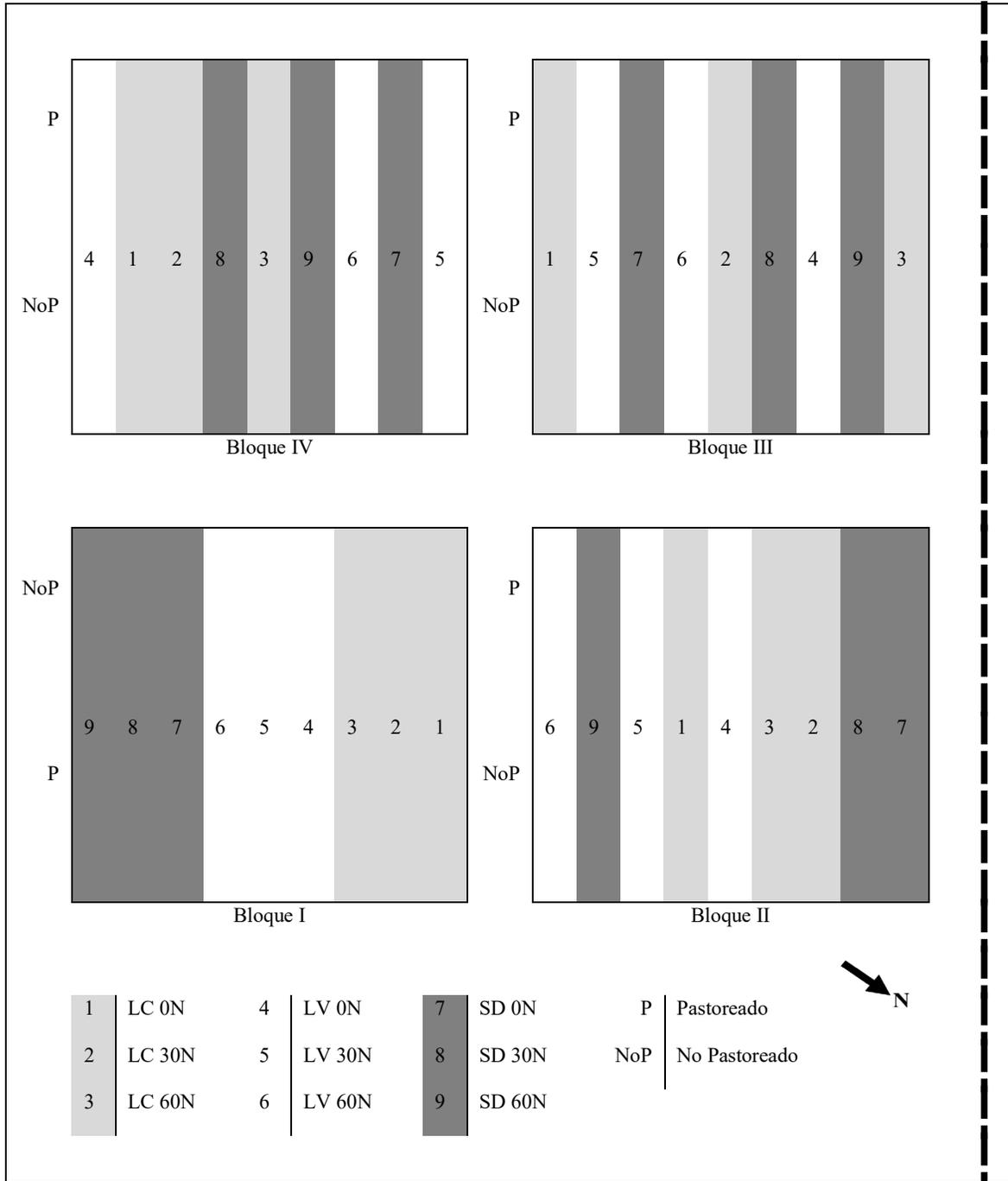


Figura 2.4 Esquema del diseño experimental del ensayo de labranzas.

### 2.2.2 Historia del Ensayo: Manejo del Suelo y Cultivos

La historia de los cultivos y manejo para el período previo a la instalación del ensayo (1984-1998), y desde el inicio del ensayo de labranzas hasta el comienzo de la presente tesis (1999-2008), se detallan en la **Tabla A - 1** del Anexo.

Por otra parte en las **Tablas A - 2, A - 3 y A - 4** del Anexo, se describen detalladamente los manejos que recibió el ensayo durante los años 2009, 2010 y 2011, respectivamente, años en los cuáles se tomaron las muestras para la realización de la tesis.

### 2.2.3 Antecedentes del Ensayo

Los objetivos parciales del ensayo de labranzas iniciado en 1999 eran:

- Cuantificar el contenido y distribución de la MO y nutrientes en los 20 cm superficiales del suelo bajo diferentes sistemas de labranzas.
- Caracterizar las fracciones orgánicas, evaluando contenidos, distribución y calidad, en diferentes profundidades.
- Cuantificar parámetros físicos relacionados con la dinámica del agua edáfica.
- Determinar el efecto del pastoreo de verdeos de invierno en siembra directa, sobre las propiedades físicas y químicas del suelo y el comportamiento del cultivo siguiente.

Estos propósitos se han cumplido y han generado información muy útil para la región semiárida del suroeste bonaerense.

Estudios sobre el efecto del pisoteo animal sobre la densidad aparente (DA) y la porosidad total (PT) del suelo en los lotes bajo SD, han observado luego de 8 años de iniciada la experiencia y 3 ciclos de pastoreo, que el pisoteo animal no produjo cambios en la DA y PT respecto de los valores al inicio de la experiencia, mostrando que es factible el desarrollo de un modelo productivo con inclusión de ganadería en SD, en la región semiárida pampeana. Por otra parte, al evaluar el efecto del pisoteo animal, señalan que las diferencias en la PT entre tratamientos se deben a que en las parcelas no pastoreadas hay un aumento de la macroporosidad entre los 5-15 cm de profundidad [16].

En el ensayo de labranzas se ha estudiado también la relación entre el carbono orgánico y algunas propiedades físicas del suelo. Se ha encontrado una relación positiva importante

entre el carbono orgánico y la PT del suelo (principalmente los macroporos). Analizando los sistemas de labranza por separado, se ha observado que la fracción lábil del carbono está fuertemente asociada a los macroporos en SD y a los mesoporos en LC, por lo que los autores sugieren que hay distintos mecanismos de estabilización de la porosidad en cada uno de los sistemas de labranza [66]. No se han encontrado diferencias entre el carbono y el nitrógeno edáfico por efecto del sistema de labranza y la fertilización nitrogenada, pero se ha observado en la superficie de las parcelas con SD un aumento de las formas más lábiles del carbono orgánico y al cabo de 6 y 8 años de implementados los sistemas también un aumento de las fracciones más estables. En cambio, la LC y LV tuvieron valores mayores por debajo de los 5 cm [67].

Varios trabajos han evaluado el efecto de diferentes factores sobre el rendimiento de trigo en el SO bonaerense. El análisis del efecto de las labranzas y la fertilización nitrogenada sobre los rendimientos de trigo en varias campañas, mostró una marcada variación entre años, ya que la productividad del cultivo estuvo estrechamente relacionada con las lluvias. Se ha encontrado que los efectos del sistema de labranza y de N interactúan permanentemente, entre sí y con el clima, lo que justifica los rendimientos del trigo. La interacción se caracterizó por presentar una mayor respuesta relativa a N por parte de SD, especialmente con la dosis de 60N. Sin embargo esta respuesta, que permitió superar los rendimientos de LV y LC, no se expresó en todas las campañas sino preferentemente en aquellas donde las lluvias no resultaron limitantes [65]. El análisis del efecto de la rotación y la fertilización nitrogenada sobre los rendimientos de trigo, ha demostrado que la fertilización es afectada por la variabilidad climática y el efecto difiere según la secuencia de cultivos. Además, la respuesta del cultivo a una dosis de 30 kg N ha<sup>-1</sup> es variable según el año y no muestra interacción con la secuencia de cultivos. Por lo tanto, los autores proponen que aprovechar los efectos de rotación resulta menos riesgoso desde el punto de vista económico, que la utilización de fertilizantes sintéticos [68].

## 2.3 Diseño de muestreo

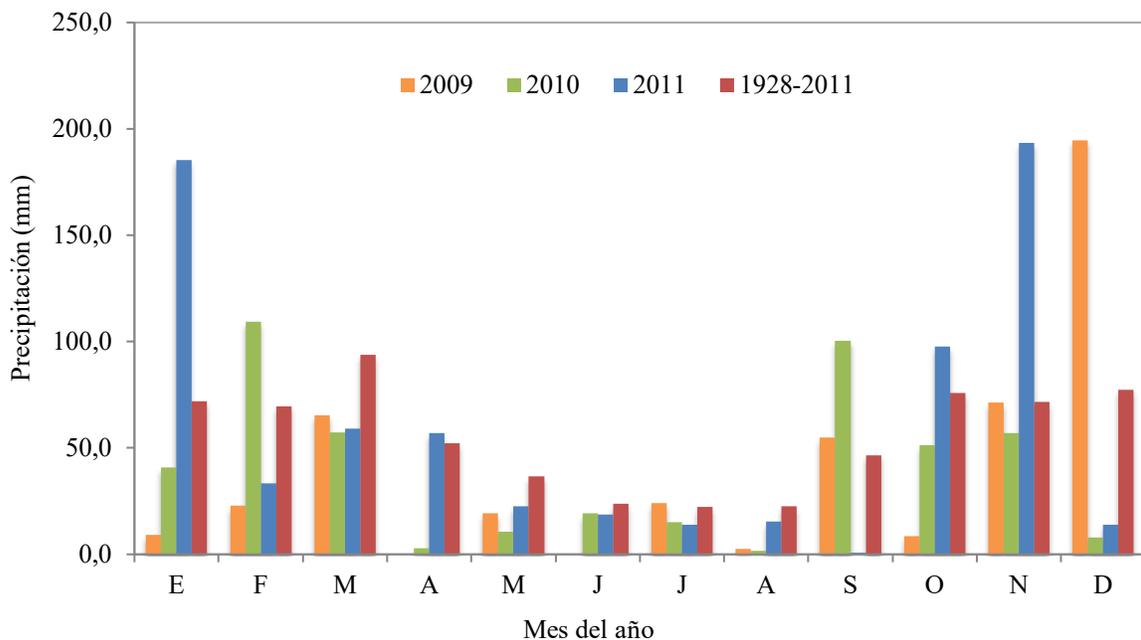
Para el presente estudio se seleccionaron los tratamientos bajo LC y SD de los bloques I, II y III. Los dos primeros años de muestreo, 2009 y 2010, se seleccionaron los tratamientos bajo LC y SD de los bloques I, II y III [Bloque (3) x Labranza (2) x Fertilización (3) x Manejo del verdeo (2)]. La toma de muestras se realizó haciendo 20/30 piques a 12 cm de profundidad en cada una de las 36 unidades experimentales, utilizando muestreador de balde. Durante el año 2011 se tomaron muestras a dos profundidades (0-5 cm y 5-20 cm) sólo de las unidades experimentales fertilizadas con 30 kg N ha<sup>-1</sup> [Bloque (3) x Labranza (2) x Manejo del verdeo (2) x Profundidad (2)].

En total se realizaron 10 muestreos en 3 años (**Tabla 2.3**). Las muestras fueron refrigeradas para el traslado hasta el laboratorio, donde fueron homogeneizadas, cuarteadas y fraccionadas. Las determinaciones se hicieron inmediatamente después del muestreo.

**Tabla 2.3** Fechas de muestreo, estación climática y profundidad.

Año	Fecha de muestreo	Estación climática	Profundidad (cm)	Código de Muestreo
2009	30 de Abril	Otoño	0-12	BOR1
	3 de Noviembre	Primavera	0-12	BOR2
2010	1° de Junio	Otoño	0-12	BOR3
	11 de Agosto	Invierno	0-12	BOR4
2011	28 de Abril	Otoño	0-5 y 5-20	BOR5
	14 de Junio	Otoño	0-5 y 5-20	BOR6
	26 de Julio	Invierno	0-5 y 5-20	BOR7
	7 de Septiembre	Invierno	0-5 y 5-20	BOR8
	18 de Octubre	Primavera	0-5 y 5-20	BOR9
	18 de Noviembre	Primavera	0-5 y 5-20	BOR10

En el Anexo de esta tesis se adjuntan los datos mensuales de temperatura media (°C) y precipitaciones (mm) registrados en la EEA INTA Bordenave para los años 2009 (**Tabla A - 5**), 2010 (**Tabla A - 6**) y 2011 (**Tabla A - 7**). La variabilidad de la lluvia entre años y dentro de un mismo año es una característica de la región semiárida en la que se encuentra el sitio de estudio (**Figura 2.5**). Los años de muestreo 2009 y 2010 fueron particularmente “secos”, las precipitaciones alcanzaron un total anual de 472,9 y 473,9 mm respectivamente, y los cultivos no llegaron a cosecha; mientras que en el año 2011 se registraron 711,4 mm, un valor por encima de la media para esa zona, que mejoró sustancialmente las condiciones de humedad del suelo.



**Figura 2.5** Precipitaciones mensuales de los años 2009, 2010 y 2011, y promedio histórico mensual.

La diferencia en el número de muestreos de un año a otro se debió a estas condiciones climáticas, ya que el objetivo inicial de la tesis era evaluar el impacto de la fertilización sobre las comunidades microbianas, haciendo un seguimiento del cultivo presente. Debido a que en los años 2009 y 2010 los cultivos no llegaron a madurez, no fue posible evaluar el cambio de las comunidades microbianas a la par del crecimiento del cultivo. Además, en vista de los resultados de esos dos años, se tomó la decisión de recolectar muestras sólo de

los tratamientos fertilizados con 30 kg N ha<sup>-1</sup>, ya que no se encontraban diferencias significativas en las mediciones microbiológicas a causa de la dosis de nitrógeno. Afortunadamente aumentaron las precipitaciones en el año 2011 y se decidió aumentar el número de muestreos anual, llegando a una distribución de un muestreo cada 45 - 60 días.

# CAPÍTULO 3

## ABUNDANCIA Y RESPIRACIÓN MICROBIANA EN SUELOS CON DIFERENTE MANEJO AGRÍCOLA

### 3.1 Introducción

Estimar la calidad de los suelos es importante, puesto que contribuye a establecer la sustentabilidad de los diferentes sistemas de manejo. Si aceptamos que la calidad del suelo se refiere a un adecuado funcionamiento; la degradación o la restauración de los suelos podrían ser evaluadas a través del análisis de las propiedades que determinan las principales funciones del suelo, en particular las propiedades que responden a los cambios en el manejo [69, 70].

La composición y la cantidad de materia orgánica edáfica juegan un rol fundamental en el funcionamiento y sustentabilidad de los sistemas agropecuarios, debido a que impactan significativamente sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo [71]. Este parámetro usualmente es utilizado como indicador de calidad de suelo, pero para detectar cambios como resultado de los disturbios generalmente se requieren muchos años (5-10 años). No obstante, la mineralización de la materia orgánica de suelo es controlada principalmente por el tamaño y la actividad de la biomasa microbiana que puede responder a los disturbios en una escala de tiempo menor. Los parámetros biológicos y bioquímicos tienden a reaccionar de manera más rápida y sensible a los cambios producidos por el manejo, por lo tanto podrían constituir una señal temprana y sensible y ser de utilidad para estimar la calidad edáfica, incluso antes que las propiedades físicas y químicas [72].

Los microorganismos, a pesar de sus relativamente bajas cantidades, juegan un rol fundamental en el mantenimiento y dinámica de los nutrientes a través del ciclado de la materia orgánica [73]; de esta forma, la actividad de los microorganismos resulta un factor clave en la fertilidad del suelo, así como en la estabilidad y funcionamiento de ecosistemas naturales y de los agroecosistemas. El número de bacterias tiene una estrecha relación con algunas propiedades físicas del suelo, como la textura, estructura, porosidad, aireación y retención de humedad, ya que su actividad se beneficia con una mayor disponibilidad de oxígeno, principalmente en aquellos suelos con poca compactación y sin excesos de agua. La actividad microbiana del suelo puede ser estimada en la determinación de la respiración basal. Esta consiste en determinar la producción de  $O_2$  en el medio o bien la concentración de  $CO_2$  desprendido, función de la actividad biológica y del contenido del suelo en carbono orgánico fácilmente mineralizable. El  $CO_2$  se determina mediante la técnica de incubación estática que captura el producto de mineralización en una solución alcalina durante un periodo de tiempo bajo condiciones ambientales óptimas [74–76]. Comúnmente se analiza la tasa de evolución de  $CO_2$  proveniente de la mineralización del sustrato orgánico del suelo. El flujo de  $CO_2$  teóricamente representa una medición integrada de la respiración de raíces, respiración de la fauna del suelo y la mineralización del carbono desde las diferentes fracciones de la materia orgánica del suelo y del mantillo. A pesar de sus limitaciones, la respiración continúa siendo el método más popular que se usa como indicador de la actividad microbiana y de la descomposición de sustratos específicos del suelo. Estos parámetros indican de manera fehaciente la mineralización que ocurre en el sustrato orgánico del suelo y son indicadores de la calidad de la materia orgánica y salud del suelo [77].

La importancia que tiene el proceso de desnitrificación en los agroecosistemas es clara, por la liberación microbiana a la atmósfera de los óxidos de N perjudiciales, y también por la eliminación de nitratos de la zona radicular [64]. Por lo tanto se considera importante la estimación del número de bacterias reductoras de nitrato y desnitrificantes en suelos sometidos a diferentes sistemas de manejo.

Las bacterias nitrificantes comprenden un universo totalmente diferente al de las bacterias desnitrificantes. Mientras que los microorganismos oxidadores de amonio y nitrito comprenden un número reducido de géneros y todos ellos relacionados filogenéticamente

[41], los microorganismos desnitrificantes pertenecen a más de 60 géneros diferentes. La capacidad para desnitrificar puede observarse en géneros que están alejados filogenéticamente, mientras que cepas estrechamente relacionadas pueden mostrar diferentes vías respiratorias [56].

Las técnicas de recuento en placa o el número más probable (NMP) han permitido cuantificar la comunidad microbiana. Está bien establecido que los recuentos de placas estiman sólo 1-10% de la microbiota total del suelo. La discrepancia se debe esencialmente a la interdependencia de los distintos organismos, a la incapacidad para crear en cultivo puro, las condiciones ambientales que enfrentan los microorganismos en el ambiente del suelo, y al hecho de que algunas especies microbianas son cultivables sólo bajo ciertas condiciones fisiológicas [27].

La ecología de las poblaciones desnitrificantes en el suelo sigue siendo en gran parte desconocida, a pesar del papel esencial en el ciclo del nitrógeno, y los problemas económicos y ambientales que se asocian con ella. Al igual que con otras comunidades funcionales bacterianas implicadas en el ciclo del nitrógeno, tales como las nitrificantes [41] o diazótrofas [78], numerosas herramientas moleculares han sido desarrolladas para evaluarlas.

Debido a que la desnitrificación no está asociada a un grupo taxonómico específico [37], los genes 16S rRNA no se pueden utilizar para evaluar las comunidades desnitrificantes [39]. En su lugar, los genes funcionales (*narG/narX*, *nirS/nirK*, *qnorB/norB*, *nosZ*) que codifican las enzimas desnitrificantes son la única manera de evaluar y describir la composición de las comunidades desnitrificantes por enfoques basados en PCR [79]. Sin embargo, las herramientas están disponibles para las bacterias diana que son genéticamente capaces de realizar los diferentes pasos y ningún método puede capturar la vía completa.

Los suelos son muy complejos y heterogéneos, sin embargo se cree que un número de factores ambientales clave, afectan la distribución y las actividades de las poblaciones microbianas más profundamente. Estos incluyen el contenido de humedad del suelo, pH, aporte de nitrógeno, la vegetación y la contaminación [41]. La comprensión de los factores que dan forma a las comunidades bacterianas del suelo es fundamental para su vinculación a los procesos a escala de ecosistema.

En este contexto se plantea que las determinaciones microbianas proveerán una indicación sensitiva de la respuesta de la actividad microbiana a los diferentes manejos de suelo [75] resultado del laboreo, fertilización y manejo del verdeo; estimando que los suelos con menor disturbio serán los que tengan mayor actividad microbiana.

Para este capítulo se planteó: evaluar el efecto de distintos sistemas de manejo agrícola sobre la respiración microbiana en suelos semiáridos; estimar mediante técnicas dependientes de cultivo la abundancia bacteriana, particularmente de microorganismos involucrados en la fertilidad del suelo; y realizar un análisis exploratorio sobre la presencia en el suelo de genes de función de bacterias nitrificadoras y desnitrificadoras.

## 3.2 Materiales y Métodos

### 3.2.1 Muestreo de suelos y determinación de humedad

Los muestreos realizados y los tratamientos seleccionados, son los que se detallan en el Capítulo 2 (**Sección 2.3**). Para cada muestra se determinó el contenido de agua de los suelos por el método gravimétrico mediante el secado en estufa [80]. Se colocaron aproximadamente 10 g de suelo en una cápsula de aluminio, y después de una incubación en estufa de secado a 105°C, se determinó el porcentaje de agua en base al peso seco del suelo. En las **Tablas A - 8** y **A - 9** del Anexo, se detallan los datos de humedad registrados para cada una de las muestras tomadas en los 3 años analizados.

### 3.2.2 Nitrógeno disponible en el suelo

Se realizó la determinación en suelo del Nitrógeno Disponible ( $N_{\text{disp}}$ ) en cada muestra, de acuerdo al método de extracción y cuantificación de las formas de nitrógeno por arrastre de vapor [81], para las muestras de los muestreos BOR2 a BOR10. En principio, el método requiere la preparación de un extracto de suelo con una solución que recupere cuantitativamente  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  presentes en la muestra. Para esto se pesaron 10 g de suelo húmedo en tubos plásticos de 100 mL y se agregaron 50 mL de solución extractiva de Sulfato de Potasio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) (Cicarelli, Argentina) 0,9%. Luego los tubos se taparon, se agitaron en vaivén a temperatura ambiente durante 30 minutos y se dejaron reposar otros 30

minutos, por último se filtró la suspensión hasta obtener un volumen considerable de extracto. Paralelamente se desarrolló un blanco conteniendo solo la solución extractiva.

Una vez hecho el extracto se procedió a la destilación. Para obtener el  $\text{N-NH}_4^+$  se colocaron en un balón de destilación 0,2 g pesados de óxido de magnesio (Química Industrial Bahiense, Argentina) y 10 mL de la solución filtrada, y se destiló por arrastre de vapor. Al menos 30 mL del destilado o vapor condensado se recogieron en un erlenmeyer de 50 mL al que se le había incorporado previamente 5 mL de Ácido Bórico (Anedra, Argentina) 2% con Indicador Mixto. El indicador se preparó disolviendo 0,165 g de Verde de Bromocresol (J. T. Baker, USA) y 0,11 g de Rojo de Metilo (J. T. Baker, USA) en 250 mL de etanol. Luego se procedió a determinar  $\text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$  después de la remoción de  $\text{N-NH}_4^+$  en la muestra. Para esto se agregó 0,1 g de Aleación de Devarda al mismo balón con el que se terminó de destilar el amonio, y luego se recogió el destilado en un nuevo erlenmeyer bajo las mismas condiciones que para el amonio. Finalmente los destilados se titularon con ácido sulfúrico 0,005 N, con viraje de color verde a un rosa pálido y se calculó el nitrógeno disponible con la siguiente **Ecuación**:

$$\mathbf{N_{Disponible} (mg\ kg^{-1}) = (S - B) \frac{(70 \times 50 \times F_h)}{10 \times 10}} \quad \mathbf{(E\ 3.1)}$$

Donde:

S = Volumen gastado en la titulación de la muestra (mL)

B = Volumen gastado en la titulación del blanco (mL)

70 =  $14 \times 1000 \times 0.005$  (Normalidad del ácido)

50 = Volumen usado de solución extractiva (mL)

Fh = Factor de corrección de humedad

10 = Peso del suelo utilizado en el análisis (g)

10 = Alícuota analizada (mL)

Los datos obtenidos con la ecuación se expresaron en  $\text{kg N}_{\text{disp}} \text{ ha}^{-1}$  suelo, utilizándose para la conversión una densidad aparente de  $1,33 \text{ Mg m}^{-3}$ .

### 3.2.3 Análisis de la microbiota heterótrofa aerobia

#### 3.2.3.1 Recuento de bacterias heterótrofas aerobias

El número de bacterias heterótrofas aerobias (BHA) presentes en el suelo se determinó por medio de la técnica del Número Más Probable (NMP) utilizando placas multipozos de 12 x 8. Para esto, de cada muestra se suspendieron sub-muestras de 10 g de suelo en 90 mL de solución fisiológica (SF) [NaCl (Anedra, Argentina) 0,85%], se agitó a 400 rpm durante 30 minutos, se filtró y se procedió a hacer una serie de diluciones decimales para la estimación del número de BHA ( $NMP_{BHA}$ ). Se inocularon alícuotas de 100  $\mu$ L de cada dilución (8 réplicas por nivel de dilución) en 100  $\mu$ L de Caldo Nutritivo (CN) doble concentración (2X) (16 g L<sup>-1</sup>) (Britania, Argentina). Las microplacas se incubaron en aerobiosis a 28°C alrededor de 2-3 días hasta la aparición de turbidez, condición que se tomó como criterio para considerar la presencia de BHA. Para cada una de las microplacas se registró la presencia (+) o ausencia (-) de BHA, y se obtuvo el  $NMP_{BHA}$  de acuerdo a las tablas propuestas por Rowe y col. [82]. Los resultados del número de bacterias se expresaron como  $\log_{10}$  NMP.

#### 3.2.3.2 Respiración del Suelo

El estudio de la respiración del suelo se efectuó por determinación de la mineralización del C bajo condiciones controladas, de acuerdo al método de absorción en álcali seguido de titulación [76]. De cada repetición se pesaron 100 g de suelo fresco en frascos de boca ancha con tapa a rosca. Luego se colocó un vial dentro de cada frasco conteniendo 30 mL de NaOH (Anedra, Argentina) 0,25 N. Los frascos se cerraron herméticamente. Simultáneamente se prepararon blancos sin suelo. Los frascos se incubaron en estufa a 28°C durante una semana. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la cantidad de CO<sub>2</sub> desprendido en cada recipiente. Brevemente, a 10 mL de la solución de NaOH se le agregó 3 mL de una solución de BaCl<sub>2</sub> (Cicarelli, Argentina) 3N. Inmediatamente antes de la titulación con HCl (Cicarelli, Argentina) 0,25 N, se agregaron 3-4 gotas de una solución alcohólica de fenolftaleína (Mallinckrodt, USA), que sirvió como indicador de equimolaridad. La cantidad de CO<sub>2</sub> liberado de los suelos por día se calculó aplicando la ecuación 3.2.

$$\text{Producción de CO}_2 \text{ (mg CO}_2 \text{ kg}^{-1}\text{suelo día}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{B}-\text{S})\times\text{N}\times 22\times 3}{7} \quad (3.2)$$

Donde:

B = Volumen de HCl consumido con el blanco (mL)

S = Volumen de HCl consumido con el suelo (mL)

N = Normalidad del HCl

22 = Factor de conversión (1 meq CO<sub>2</sub> = 22 mg CO<sub>2</sub>)

3 = Factor de corrección, por tomar una alícuota de 10 mL de NaOH

7 = Días de incubación

### 3.2.4 Análisis de las comunidades nitrificadoras, reductoras de nitrato y desnitrificadoras

#### 3.2.4.1 Recuento bacteriano por métodos cultivables

##### *Bacterias reductoras de nitrato y desnitrificadoras*

El número de bacterias reductoras de nitrato (BRN) y bacterias desnitrificantes (BD) presentes en el suelo se determinó, al igual que las BHA, por medio de la técnica NMP utilizando placas multipozos de 12 x 8. Se inocularon alícuotas de 100 µL de cada dilución (8 réplicas por nivel de dilución), en 100 µL CN 2X suplementado con 0,4 g L<sup>-1</sup> de Nitrato de Potasio (KNO<sub>3</sub>) (Timper, Argentina).

Las microplacas se incubaron a 28°C durante 13 días en anaerobiosis. Para generar las condiciones anaeróbicas se utilizó el sistema Anaerocult<sup>®</sup> A mini (Merck, Germany), que es el producto generador de una atmósfera exenta de O<sub>2</sub>; bolsas de incubación especiales con Anaeroclip<sup>®</sup> (Merck, Germany); y Anaerotest<sup>®</sup> (Merck, Germany) como indicador del cambio a una atmósfera anaerobia. Una vez finalizado el período de incubación, se reveló la presencia de BRN y BD utilizando el Reactivo de Nitritos de Griess-Ilosvay (Merck, Germany), cuyo principio se describe en el **Recuadro 3.1**. Para la interpretación de los resultados se siguió el mismo patrón que Fernández [64], quien realizó la prueba de reducción del nitrato según Fadin [83] y se interpreta de igual forma que el reactivo de Griess-Ilosvay. Luego se obtuvo el NMP<sub>BRN</sub> y NMP<sub>BD</sub> [82]. Los resultados se expresaron como log<sub>10</sub> NMP.

**Recuadro 3.1** Prueba de Griess-Ilosvay

El reactivo de Griess-Ilosvay sirve para detectar nitrito microbiano, a fin de identificar los microorganismos reductores de nitrato. Con este fin se añadieron unas gotas de reactivo de nitritos al cultivo y se esperó alrededor de un minuto. La aparición de color rojo en esta primera etapa de la reacción, indica que el nitrato presente en el medio de cultivo ha sido reducido a nitrito por los microorganismos, mientras que si no hay desarrollo de color se agrega polvo de zinc. Si se desarrolla color rosado a rojo en esta segunda etapa, significa que el nitrato presente en el medio no ha sido reducido por el organismo ya que fue reducido por el zinc. Si no hay color, se interpreta que hay ausencia de nitrito en el medio de cultivo porque el organismo redujo el nitrato en nitrito y luego redujo nuevamente el nitrito.

**Interpretación del reactivo de Griess-Ilosvay**

Etapa de la reacción	Interpretación
<b>1ª etapa: GRIESS-ILOSVAY</b>	
POSITIVA (rojo-rojo amarillo)	Nitrito presente ( <i>Bacterias Reductoras de Nitrato</i> ) (pozos +)
NEGATIVA (sin color)	
↓	
<b>2ª etapa: Prueba del polvo de Zinc:</b>	
POSITIVA (sin color)	No se detecta nitrato ni nitrito en el medio de cultivo ( <i>Bacterias Desnitrificantes</i> ) (pozos ++)
NEGATIVA (rosado a rojo)	Nitrato presente

*Bacterias oxidadoras de amonio y nitrito*

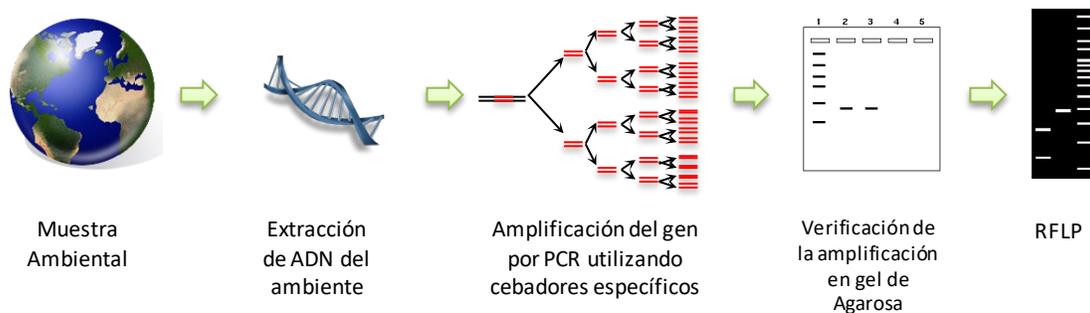
Para determinar la abundancia de las bacterias involucradas en la nitrificación por NMP, en un primer intento se siguió el procedimiento descrito por Roux-Michollet y col. [84]. Se incubaron placas multipozos de 4 x 6 que contenían 500 µL de medio selectivo de sales minerales en doble concentración, con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Cicarelli, Argentina) ó NaNO<sub>2</sub> (Cicarelli, Argentina), para oxidadoras de amonio (BOA) o nitrito (BON) respectivamente.

Por cada dilución, seis pozos fueron inoculados con 500  $\mu\text{L}$  de inóculo. Las microplacas se incubaron a 28°C en oscuridad durante 9 semanas. Este procedimiento resultó erróneo, ya que el tiempo de incubación es tan extenso, que el volumen incorporado en las microplacas se evaporó. Por lo tanto, se cambiaron las microplacas por tubos Eppendorf de 1,5 mL y luego por tubos de 2,5 mL, aumentando el volumen de medio e inóculo. La presencia de BOA y BON se reveló utilizando el mismo reactivo que para las BRN y BD, evaluando la aparición de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , respectivamente; y luego se determinó el  $\text{NMP}_{\text{BOA}}$  y  $\text{NMP}_{\text{BON}}$ .

### 3.2.4.2 Análisis por métodos no cultivables

A partir de los resultados obtenidos por métodos cultivables, se realizó un análisis exploratorio sobre la presencia de genes funcionales de bacterias nitrificadoras y desnitrificadoras. Para esto, se realizó una selección del total de muestras tomadas del suelo superficial (0-5 cm) durante diferentes muestreos del año 2011 (**Tabla 2.3**), debido a que durante ese año se mantuvo una frecuencia de muestreos periódica, y además en los primeros 5 cm del suelo fue donde se observaron las mayores diferencias entre tratamientos con las variables evaluadas y descritas anteriormente. Para la elección de los muestreos, también se tuvieron en cuenta los resultados de abundancia y respiración microbiana, y se seleccionaron de forma intercalada, es decir, el primer, tercer y quinto muestreo del 2011 (BOR5, BOR7 y BOR9, respectivamente) de modo de cubrir el transcurso del año.

Para la evaluación por métodos moleculares se siguió un enfoque convencional (**Figura 3.1**). Las muestras tomadas en el campo se trasladaron refrigeradas al laboratorio, y se man-



**Figura 3.1** Procedimiento para el análisis de las comunidades bacterianas con un enfoque basado en PCR.

tuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de ácidos nucleicos. Las réplicas (Bloques) no se agruparon (poolearon) sino que se trabajaron individualmente. Se extrajo el ADN de las muestras ambientales, luego se amplificaron los genes de interés por PCR y se estudió el polimorfismo de las muestras por RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfism).

### ***Extracción de ADN***

Para la extracción del ADN total del suelo se utilizaron kits comerciales (PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation kit, MoBio Laboratories, inc., CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de ácido nucleico se evaluó en gel de agarosa. Las muestras se preservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de análisis.

### ***Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los genes de función***

Para una correcta amplificación del fragmento de interés en las muestras bajo estudio, fue necesario realizar ajustes en las condiciones químicas de la mezcla para PCR, así como en las condiciones térmicas para llevar a cabo la reacción. En la **Tabla 3.1** se detallan los principales cambios para poner a punto la amplificación de los genes *narG*, *nirK* y *nosZ*. En la **Tabla 3.2** se muestran las condiciones químicas definitivas; y en la **Tabla 3.3** las condiciones térmicas finales y los cebadores específicos utilizados para amplificar los genes de función de bacterias oxidantes de amonio (*amoA*) y bacterias desnitrificantes (*narG*, *nirK/nirS* y *nosZ*).

Para los genes *narG*, *nirK* y *nosZ* se implementó un protocolo con gradiente de temperatura (*touch-down*). Se incluyó el ADN de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, como controles positivos para *narG* [85], *nirK*, *nirS* y *nosZ* [86], respectivamente. Además para *nosZ*, se utilizó como control positivo la cepa *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. USDA110, anteriormente *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 [87], ampliamente conocida por su capacidad desnitrificante. El producto PCR (4  $\mu\text{l}$ ) se sembró en un gel de agarosa (Conda) al 2% en tampón TAE, y en las calles laterales se sembró el marcador de peso molecular *Fast Ruler DNA Ladder Low Range* (Fermentas, Canadá). Para la amplificación del gen *nosZ* de comunidades microbianas del suelo, además de los ajustes de PCR detallados, fue necesario diluir algunas muestras (1:50, 1:100 o 1:250) para lograr una correcta amplificación.

Con el fin de probar si existían cambios en la estructura de la comunidad de bacterias desnitrificantes, algunos productos de amplificación PCR obtenidos de *nosZ*, fueron digeridos con la enzima de restricción *BsuRI* (*HaeIII*), que reconoce 4 bases y genera cortes de extremos romos. La mezcla de reacción se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Fermentas, Canadá), se agregaron 5  $\mu$ l de producto PCR en un volumen final de 16  $\mu$ l, y se incubó por 16 h a 37°C. La reacción se detuvo incubando a 80°C por 20 min. Los fragmentos de restricción se resolvieron por electroforesis, sembrando 10  $\mu$ l del producto digerido y 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular VIII de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en gel de agarosa Metaphor (FMC Bioproducts, Francia) al 3,5% con tampón TAE (60 V, 120 min).

Todos los geles se tiñeron con Gel Red y se fotografiaron en un transiluminador UV TFX 20-M (Life Technologies Corp., Rockville, MD, EEUU). Las imágenes se analizaron con el software Kodak Digital Science Image Analysis, versión 3.0 (Eastman Kodak Company, NY, EEUU).

**Tabla 3.1** Ajustes químicos, térmicos y de tiempos, para la reacción de PCR de los genes *narG*, *nirK* y *nosZ*.

Ajustes químicos en la mezcla PCR						Ajustes de temperatura y tiempos en el ciclador <sup>a</sup>
Buffer (X)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	BSA (μg/μL)	dNTP (mM)	Cebadores (μM)	Taq Polimerasa (U/μL)	
<b><i>narG</i></b>						
1	2	0,4	0,2	0,5	0,025	1 ciclo (D): 5 min 95°C / 8 ciclos: 30 s 94°C (D), 30 s 59°C (-0,5°C/ciclo) (H), 45 s 72°C (P) / 30 ciclos: 30 s 94°C (D), 30 s 55°C (H), 45 s 72°C (P) / 1 ciclo (P): 6 min 72°C
1	<u>1,5</u>	0,4	0,2	0,5	0,025	1 ciclo (D): 5 min 95°C / 8 ciclos: 30 s 94°C (D), 30 s 59°C (-0,5°C/ciclo) (H), 45 s 72°C (P) / <u>35</u> ciclos: 30 s 94°C (D), 30 s 55°C (H), 45 s 72°C (P) / 1 ciclo (P): <u>10</u> min 72°C
1	1,5	0,4	0,2	0,5	0,025	1 ciclo (D): 5 min 95°C / <u>10</u> ciclos: 30 s 94°C (D), 30 s <u>55°C</u> (H), 45 s 72°C (P) (- <u>1°C/ciclo</u> ) / 35 ciclos: 30 s 94°C (D), 30 s 55°C (H), 45 s 72°C (P) / 1 ciclo (P): 10 min 72°C
1	<u>2</u>	0,4	0,2	0,5	0,025	1 ciclo (D): 5 min 95°C / 10 ciclos: 30 s 94°C (D), 30 s 55°C (H), 45 s 72°C (P) (-1°C/ciclo) / <u>30</u> ciclos: 30 s 94°C (D), 30 s 55°C (H), 45 s 72°C (P) / 1 ciclo (P): 10 min 72°C
1	2	0,4	0,2	0,5	0,025	1 ciclo (D): 5 min 95°C / 10 ciclos: <u>45 s</u> 94°C (D), <u>1 min 64°C</u> (H), <u>2 min</u> 72°C (P) (-1°C/ciclo) / 30 ciclos: <u>45 s</u> 94°C (D), <u>1 min</u> 55°C (H), <u>2 min</u> 72°C (P) / 1 ciclo (P): 10 min 72°C
<b><i>nirK</i></b>						
1	2,5	0,4	0,2	0,7	0,02	1 ciclo (D): 5 min 95°C / 10 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s 45°C (-0,5°C/ciclo) (H), 45 s 72°C (P) / 20 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s 43°C (H), 40 s 72°C (P) / 1 ciclo (P): 7 min 72°C
1	<u>2</u>	0,4	0,2	0,7	0,025	1 ciclo (D): 5 min 95°C / 10 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s <u>61°C (-1°C/ciclo)</u> (H), <u>40 s</u> 72°C (P) / 20 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s <u>51°C</u> (H), 40 s 72°C (P) / 1 ciclo (P): <u>10 min</u> 72°C
1	<u>1,5</u>	0,4	0,2	<u>0,5</u>	<u>0,02</u>	1 ciclo (D): 5 min 95°C / 10 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s <u>45°C (-0,5°C/ciclo)</u> (H), 40 s 72°C (P) / 20 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s <u>43°C</u> (H), 40 s 72°C (P) / 1 ciclo (P): 7 min 72°C
1	<u>2</u>	0,4	0,2	<u>0,7</u>	<u>0,025</u>	1 ciclo (D): 5 min 95°C / 10 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s 45°C (-0,5°C/ciclo) (H), 40 s 72°C (P) / 20 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s 43°C (H), 40 s 72°C (P) / 1 ciclo (P): 7 min 72°C

Continuación Tabla 3.1

<i>nosZ</i>						
1	1,5	0,4	0,2	1	0,05	1 ciclo (D): 2 min 94°C / 35 ciclos: 30 s 94°C (D), 1 min 57°C (H), 1 min 72°C (P) / 1 ciclo (P): 10 min 72°C
1	1,5	0,4	0,2	1	0,05	1 ciclo (D): 2 min 94°C / <b>40</b> ciclos: 30 s 94°C (D), 1 min <b>59</b> °C (H), 1 min 72°C (P) / 1 ciclo (P): 10 min 72°C
1	1,5	0,4	0,2	1	0,05	1 ciclo (D): 2 min 94°C / <b>42</b> ciclos: 30 s 94°C (D), 1 min 59°C (H), 1 min 72°C (P) / 1 ciclo (P): 10 min 72°C
1	1,5	0,4	0,2	1	0,05	1 ciclo (D): 2 min 94°C / 42 ciclos: 30 s 94°C (D), 1 min <b>60</b> °C (H), 1 min 72°C (P) / 1 ciclo (P): 10 min 72°C
1	1,5	0,4	0,2	1	0,05	1 ciclo (D): <b>5 min 95°C</b> / <b>10</b> ciclos: 30 s <b>95°C</b> (D), <b>30 s 70°C</b> (-1°C/ciclo) (H), <b>45 s 72°C</b> (P) / <b>36</b> ciclos: 30 s <b>95°C</b> (D), <b>30 s 60°C</b> (H), <b>45 s 72°C</b> / 1 ciclo (P): 10 min 72°C (P)
1	<b><u>2,5</u></b>	0,4	0,2	<b><u>0,7</u></b>	<b><u>0,02</u></b>	1 ciclo (D): 5 min 95°C / 10 ciclos: 30 s 95°C (D), 30 s 70°C (-1°C/ciclo) (H), 45 s 72°C (P) / 36 ciclos: 30 s 95°C (D), 30 s 60°C (H), 45 s 72°C / 1 ciclo (P): 10 min 72°C (P)

<sup>a</sup> D = desnaturalización, H = hibridación, P = polimerización

**Tabla 3.2** Mezcla de PCR para la amplificación de los genes *amoA*, *narG*, *nirK*, *nirS* y *nosZ*.

Reactivo	Marca	<i>amoA</i>	<i>narG</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>
Buffer	Inbio-HighWay	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (mM)	Inbio-HighWay	1,5	2	2	2,5	2,5
BSA (μg/μL)	Fermentas	0,1	0,4	0,4	0,4	0,4
Solución de dNTP (mM)	Inbio-HighWay	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cebadores (μM)	Genebiotech	0,3	0,5	0,7	1	0,7
ADN Polimerasa Taq (U/μL)	Inbio-HighWay	0,025	0,025	0,025	0,05	0,02
ADN bacteriano (ng)		25	25	10-100	10-100	10-100

**Tabla 3.3** Condiciones de PCR para la amplificación de ADNr *amoA*, *narG*, *nirK*, *nirS* y *nosZ*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Origen	Condiciones térmicas <sup>a</sup>
<i>amoA</i> <sup>b</sup> (491 bp)			
<b>1F</b>	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	Rotthauwe y col. [88]	1 ciclo (D): 5 min 94°C  42 ciclos: 1 min 94°C (D), 1 min 30 s 60°C (H), 1 min 30 s 72°C (P)
<b>2R</b>	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC		1 ciclo (P): 1 min 30 s 60°C, 10 min 72°C
<i>narG</i> (650 bp)			
<b>1960F</b>	TAY GTS GGS CAR GAR AA	Philippot y col. [85]	1 ciclo (D): 5 min 95°C  10 ciclos: 45 s 94°C (D), 1 min 64°C (H), 2 min 72°C (P) (-1°C/ciclo)
<b>2650R</b>	TTY TCR TAC CAB GTB GC		30 ciclos: 45 s 94°C (D), 1 min 55°C (H), 2 min 72°C (P)  1 ciclo (P): 10 min 72°C
<i>nirK</i> (514 bp)			
<b>1F</b>	GGM ATG GTK CCS TGG CA	Braker y col. [89]	1 ciclo (D): 5 min 95°C  10 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s 45°C (-0,5°C/ciclo) (H), 40 s 72°C (P)
<b>5R</b>	GCC TCG ATC AGR TTR TGG		20 ciclos: 30 s 95°C (D), 40 s 43°C (H), 40 s 72°C (P)  1 ciclo (P): 7 min 72°C
<i>nirS</i> (425 bp)			
<b>Cd3aF</b>	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	Throbäck y col. [86]	1 ciclo (D): 2 min 94°C  35 ciclos: 30 s 94°C (D), 1 min 57°C (H), 1 min 30 s 72°C (P)
<b>R3cd</b>	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A		1 ciclo (P): 10 min 72°C

Continuación Tabla 3.3

<i>nosZ</i> (267 bp)	
<b>2F</b>	CGC RAC GGC AAS AAG Henry y col. [90] GTS MSS GT
	1 ciclo (D): 5 min 95°C 10 ciclos: 30 s 95°C (D), 30 s 70°C (-1°C/ciclo) (H), 45 s 72°C (P)
<b>2R</b>	CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA
	36 ciclos: 30 s 95°C (D), 30 s 60°C (H), 45 s 72°C 1 ciclo (P): 10 min 72°C (P)

<sup>a</sup> D = desnaturalización, H = hibridación, P = polimerización

<sup>b</sup> Entre paréntesis detrás de cada gen se indica el tamaño de fragmento esperado en pares de bases (bp)  
R(A/G), Y(C/T), K (G/T), M (C/A), S(G/C), B(C/G/T)

### 3.2.5 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico, se utilizó el software Infostat [91]. Los datos de cada variable (nitrógeno disponible, recuentos bacterianos y respiración del suelo) para cada momento de muestreo de los años 2009 y 2010, fueron sujetos a un Análisis de Varianza (ANOVA) triple para determinar la significación de los efectos de las labranzas (L), la dosis de fertilizante nitrogenado (F) y el manejo del verdeo (V), y sus interacciones. Cuando no se encontraron efectos significativos, los datos también fueron sujetos a un ANOVA cuádruple con análisis de interacciones, con la incorporación de la fecha de muestreo (M) como una nueva variable. En las variables dependientes en las cuáles se detectó interacción entre los factores ( $p < 0,05$ ), se continuó el estudio con los factores por separado. Las medias se compararon por Diferencia Mínima Significativa (DMS o LSD) al 5%.

Para los datos correspondientes al año 2011, se llevó a cabo el mismo tipo de análisis que en los años anteriores. Dado que se eliminó el factor de fertilización pero se incorporó el de profundidad (P), el número de factores sigue siendo 4, aunque la jerarquía de los mismos es diferente: las labranzas (L) y el manejo del verdeo (V) siguen determinando un diseño en bloque dividido (factores principales), la profundidad (P) se convierte en un Factor Secundario (parcela dividida), y las fechas de muestreo (M) son, a su vez, un factor con niveles de jerarquía inferior al anterior (parcela sub-subdividida).

Si bien los tests para este diseño son bastante complejos (hay 5 Cuadrados Medios de error diferentes), se procedió a eliminar del modelo a todos los componentes de varianza aleatorios claramente no significativos ( $p \gg 0.05$ ), y a ponderar los CM de error correspondientes.

Cuando se detectaron interacciones, se procedió a descomponer el análisis según los resultados de contrastes sugeridos por los datos (método de Scheffé), o por las propuestas planteadas “a priori” por los objetivos de la investigación.

Por último, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para reducir la dimensionalidad de la información, utilizando todos los datos de las variables medidas. Para esto se determinaron los coeficientes de correlación entre las variables y se generaron ejes interpretables para ver las interrelaciones de todas las variables en forma conjunta.

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Humedad en las muestras de suelo

El ingreso de agua al suelo proveniente de lluvias difirió en los muestreos realizados, mostrando la variabilidad que hay en la zona de estudio y evidenciando ciclos meteorológicos. En el ANEXO de esta tesis se adjuntan los datos mensuales de temperatura media ( $^{\circ}\text{C}$ ) y precipitaciones (mm) registrados en la EEA INTA Bordenave para los años 2009, 2010 y 2011 (**Tablas Tabla A - 5**, **Tabla A - 6** y **Tabla A - 7**, respectivamente); así como los datos de humedad registrados para cada una de las muestras tomadas (**Tablas Tabla A - 8** y **Tabla A - 9**).

Durante los años 2009 y 2010, las muestras tomadas en el ensayo se caracterizaron por el bajo contenido de humedad, que estuvo entre 5,42 – 11,12 % para el primer año; y entre 7,86 – 16,59 % para el segundo.

Durante el año 2011 el aumento de precipitaciones mejoró sustancialmente el contenido de humedad en el suelo del ensayo. Las muestras tomadas en los diferentes muestreos a lo largo del año mostraron variación en el contenido de agua (8,83 – 22,03 %), pero superando los valores registrados para los dos años anteriores. En BOR5 y BOR7 se registraron los mayores valores de humedad en las muestras tomadas en los 5 cm superficiales, mientras que en el resto de los muestreos (BOR6, BOR8, BOR9 y BOR10), hubo mayor porcentaje

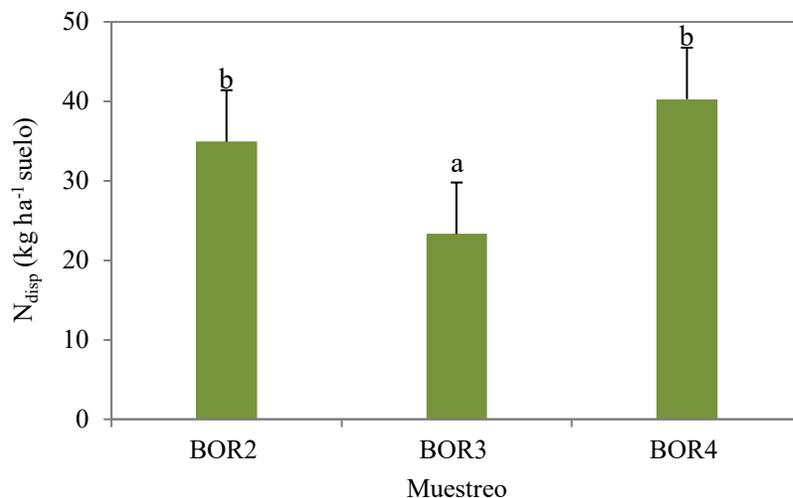
de humedad en las muestras tomadas a mayor profundidad (5-20 cm). BOR8 fue el momento donde las muestras estuvieron más secas (8,83 – 12,97 %). Durante el año 2011 se midió también el contenido de agua en lámina (mm) (datos en la **Tabla A - 10** del Anexo) y se encontró en los seis muestreos mayor cantidad de agua en los suelos bajo LC a 5-20 cm de profundidad (entre 18,48 – 36,6 mm), tanto P como NoP.

### 3.3.2 Nitrógeno disponible en el suelo

#### 3.3.2.1 Años 2009 y 2010

Se detectó una interacción significativa entre las fechas de muestreo, el laboreo y el manejo del verdeo (MxLxV:  $F=3,8$   $p<0,05$ ) para los datos de nitrógeno disponible ( $N_{\text{disp}}$ ) de las muestras tomadas durante 2009 y 2010.

No se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos en el análisis de cada fecha por separado. En cambio el análisis de los datos en promedio para cada fecha, permitió hallar diferencias entre las fechas de muestreo ( $F=14,24$   $p<0,01$ ). El test de diferencia mínima significativa de Fisher ( $\alpha = 0,05$   $DMS = 4,71641$ ) permitió observar que el primer muestreo del año 2010 fue menor a los otros dos ( $BOR3 < BOR2 = BOR4$ ). La media observada en BOR3 fue de  $23,31 \text{ kg N ha}^{-1}$ , mientras que en BOR2 y BOR4 el promedio de  $N_{\text{disp}}$  fue de  $34,93$  y  $40,28 \text{ kg N ha}^{-1}$ , respectivamente (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2** Nitrógeno disponible ( $N_{\text{disp}}$ ) ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) en promedio para cada fecha de muestreo. Las barras de error representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=36$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos.

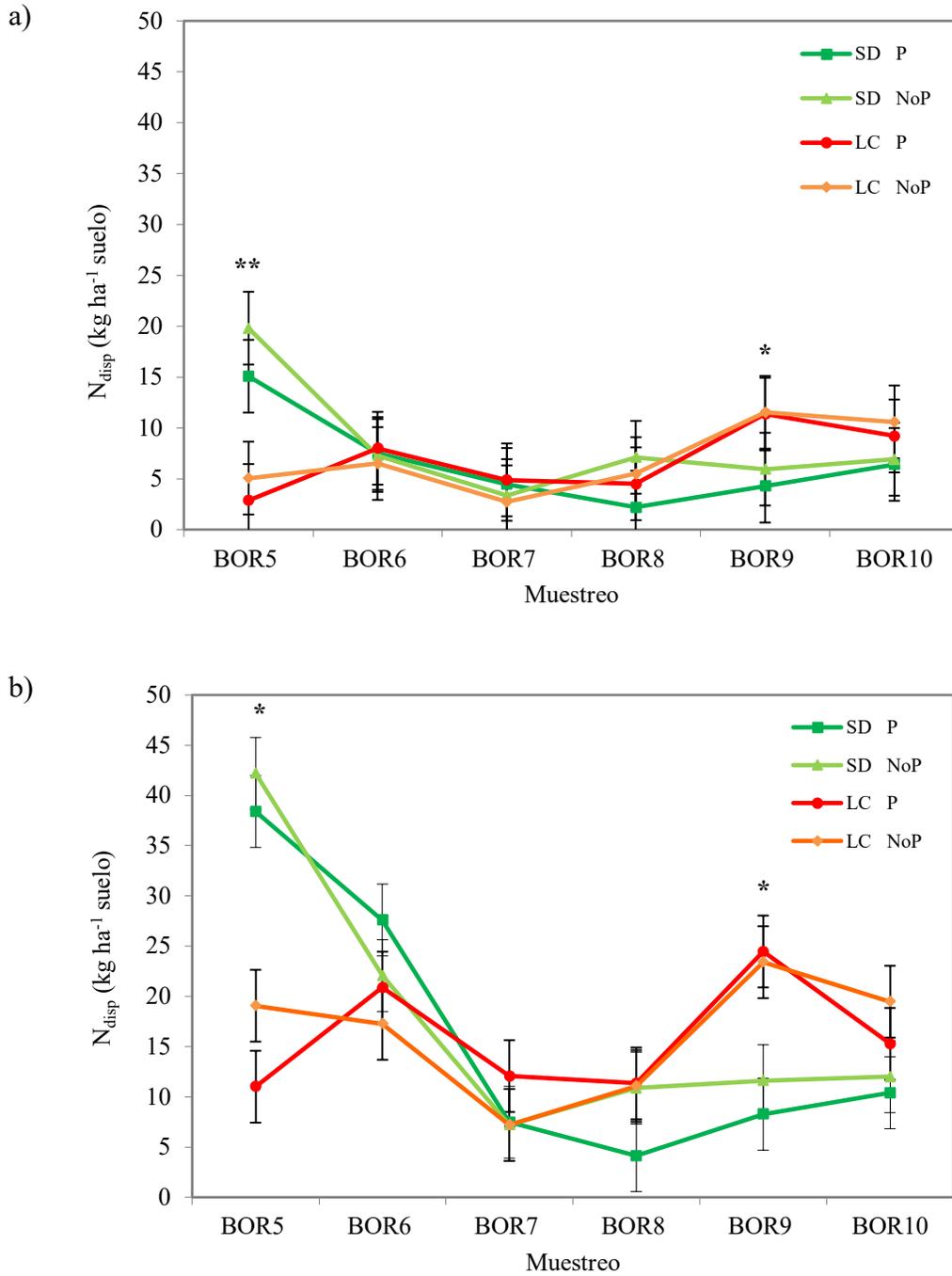
### 3.3.2.2 Año 2011

Debido a la presencia de interacciones entre las fechas de muestreo con las profundidades (MxP:  $F=4,24$   $p<0,01$ ) y el laboreo (MxL:  $F=15,2$   $p<0,01$ ), se analizó cada fecha por separado en las diferentes profundidades.

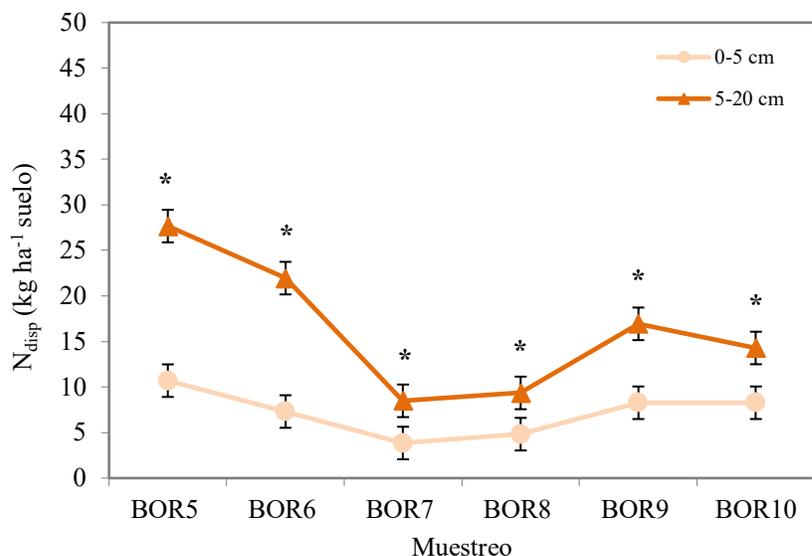
En los primeros 5 cm del suelo solo se encontraron diferencias entre los sistemas de labranza en el primer muestreo (BOR5) ( $F=203,97$   $p<0,01$ ) y el quinto muestreo (BOR9) ( $F=20,9$   $p<0,05$ ) (**Figura 3.3 a**). En BOR5 las parcelas bajo SD mostraron mayor  $N_{\text{disp}}$  (P, 15,07; NoP, 19,8 kg N ha<sup>-1</sup>) que aquellas bajo LC (P, 2,86; NoP, 5,06 kg N ha<sup>-1</sup>), mientras que en BOR9 la situación se invirtió (SD-P, 4,27; SD-NoP, 5,94; LC-P, 11,35; LC-NoP, 11,53 kg N ha<sup>-1</sup>). Para ambos muestreos, dentro de cada labranza se observó mayor  $N_{\text{disp}}$  en las parcelas NoP respecto a aquellas P, aunque sin diferencias significativas.

En la profundidad 5-20 cm, también se detectaron diferencias entre los sistemas de labranza (ambos  $p<0,05$ ) en el contenido de nitrógeno del suelo muestreado en BOR5 y BOR9, aunque hubo mayor contenido de nitrógeno que en la capa más superficial del suelo (**Figura 3.3 b**). En BOR5 se observó mayor  $N_{\text{disp}}$  en las parcelas bajo SD que bajo LC (SD-P, 38,4; SD-NoP, 42,2; LC-P, 11; LC-NoP, 19,07 kg N ha<sup>-1</sup>), mientras que en BOR9 se observó lo contrario (SD-P, 8,26; SD-NoP, 11,6; LC-P, 24,47; LC-NoP, 23,4 kg N ha<sup>-1</sup>).

Se observó en promedio, mayor contenido de  $N_{\text{disp}}$  en la capa más profunda del suelo (5-20 cm) respecto a la capa más superficial (0-5 cm) ( $p<0,01$ ) (**Figura 3.4**).



**Figura 3.3** Nitrógeno disponible ( $N_{disp}$ ) (kg ha<sup>-1</sup>) en suelos bajo Labranza Convencional (LC) y Siembra Directa (SD), sometidos a Pastoreo directo (P) o corte mecánico del forraje (NoP), para las muestras tomadas a la profundidad de 0-5 cm (a) y 5-20 cm (b) durante el año 2011. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. (n=6). Los asteriscos indican diferencias significativas (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ) entre los laboreos dentro de cada muestreo.



**Figura 3.4** Nitrógeno disponible ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) en promedio para todos los tratamientos a dos profundidades de muestreo (0-5 cm y 5-20 cm), para las muestras tomadas durante el año 2011. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=12$ ). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p<0,01$ ) entre los promedios de las profundidades dentro de cada muestreo.

### 3.3.3 Abundancia y respiración de la microbiota heterótrofa aerobia

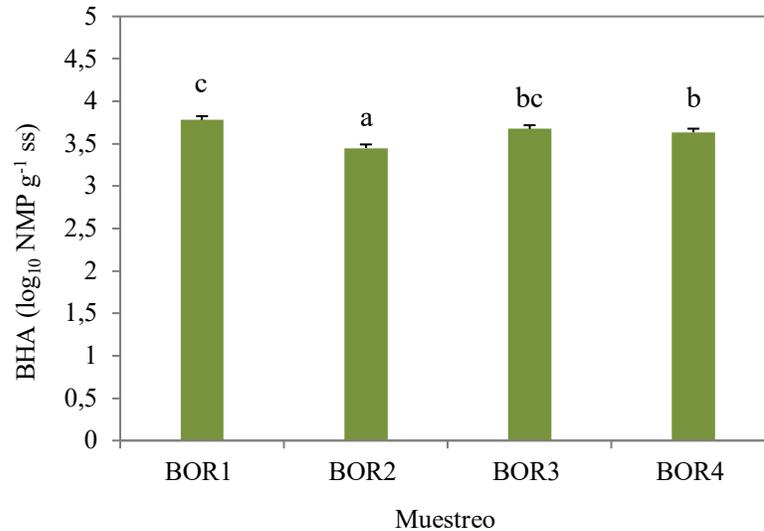
#### 3.3.3.1 Recuento de bacterias heterótrofas aerobias

##### 3.3.3.1.1 Años 2009 y 2010

De acuerdo al análisis realizado con los datos de abundancia de Bacterias Heterotróficas Aerobias (BHA), no se hallaron interacciones entre los factores evaluados.

Se encontraron diferencias significativas ( $F=11,1$ ;  $p<0,01$ ) entre las fechas, siendo la abundancia en BOR2 ligeramente menor a las demás fechas de muestreo (**Figura 3.5**). Además se observa la posibilidad de tener una diferencia entre los laboreos ( $F=3,68$ ;  $p=0,0840$ ).

En el análisis dentro de cada fecha de muestreo, se observó en BOR1 que en el suelo bajo labranza convencional el recuento bacteriano fue en promedio 0,16 unidades log ( $7,24 \times 10^3$ ) mayor que los suelos bajo siembra directa.

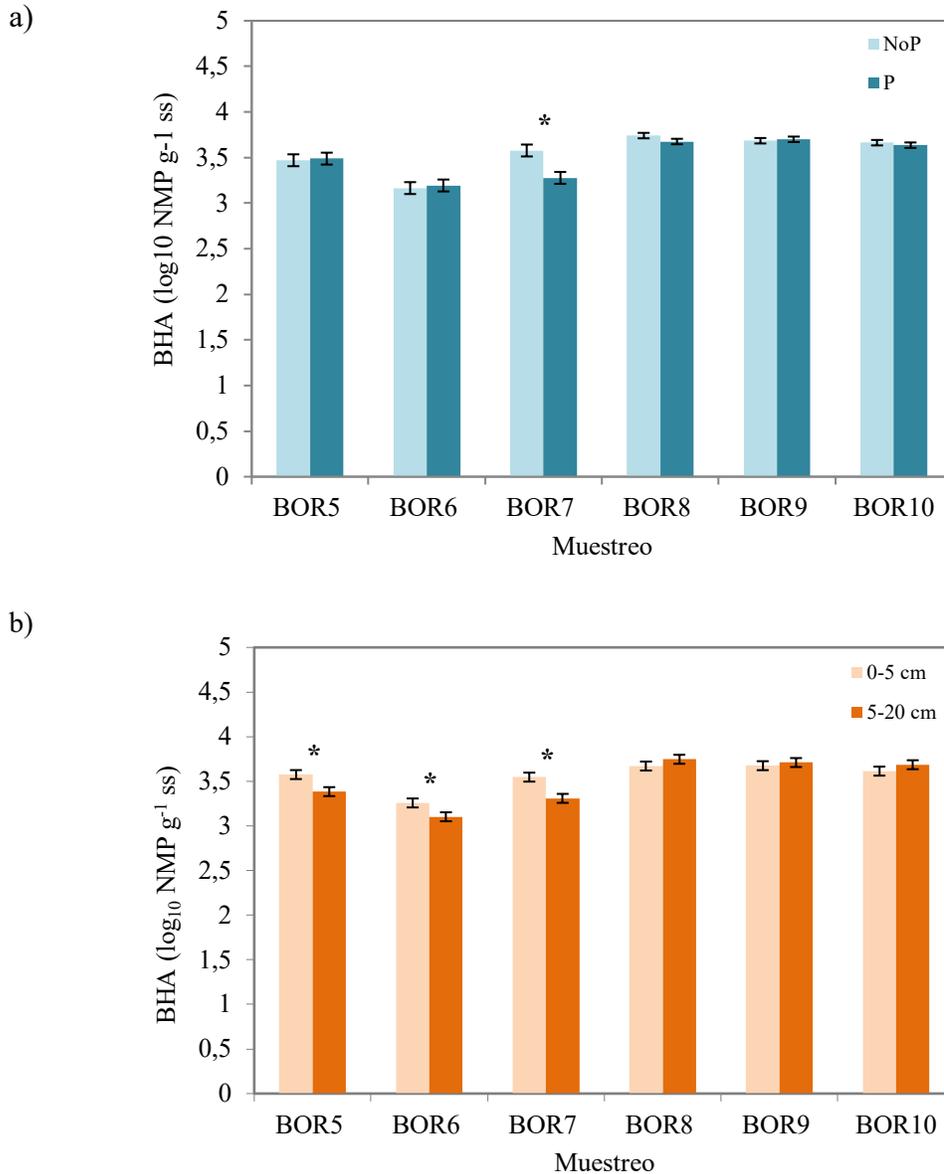


**Figura 3.5** Abundancia de Bacterias Heterotróficas Aerobias (BHA) en promedio para cada fecha de muestreo. Las barras de error representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=36$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos.

### 3.3.3.1.2 Año 2011

El análisis de varianza para la densidad de BHA durante el año 2011 presentó interacciones significativas entre las fechas de muestreo y los demás factores (MxL:  $F=3,81$ ,  $p<0,01$ ; MxV:  $F=3,09$ ,  $p<0,05$ ; MxP:  $F=4,05$ ,  $p<0,01$ ). De acuerdo al comportamiento observado se separaron las fechas en dos grupos para un nuevo análisis. Por un lado las primeras tres fechas de muestreo (BOR5, BOR6 y BOR7), y por otra parte las tres últimas fechas de muestreo (BOR8, BOR9 y BOR10).

El análisis de las tres primeras fechas muestra nuevamente interacción entre las fechas y el manejo del verdeo (MxV:  $F=4,09$ ,  $p<0,05$ ). Con lo cual al analizar los datos en promedio se observa que en BOR7 la densidad bacteriana fue significativamente mayor en los tratamientos no pastoreados ( $p<0,05$ ), superando en 0,3 unidades log ( $3,78 \times 10^3$ ) a los tratamientos pastoreados. En el resto de los muestreos no se encontraron diferencias significativas entre los dos manejos del verdeo (**Figura 3.6 a**).



**Figura 3.6** Abundancia de Bacterias Heterotróficas Aerobias (BHA) en promedio para cada fecha de muestreo del año 2011 según (a) el efecto del manejo del verdeo y (b) el nivel de profundidad de muestreo. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=12$ ). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas dentro de cada muestreo ( $p<0,05$ ).

Otra diferencia importante detectada fue debido a las profundidades, donde se observó en BOR5, BOR6 y BOR7 que la densidad de BHA fue mayor en los 5 cm superficiales ( $p<0,05$ ), mientras que en BOR8, BOR9 y BOR10 se observó mayor abundancia de BHA en la profundidad de 5-20 cm, aunque sin diferencias significativas (**Figura 3.6 b**). En los primeros 5 cm del suelo, la menor densidad bacteriana se observó durante el muestreo

BOR6 (3,2569), el cual se diferenci6 estadísticamente del resto de los muestreos, que estuvieron en el rango de 3,5463 – 3,6747. Por otra parte, en la profundidad 5-20 cm, también se observ6 la menor abundancia en el segundo muestreo del a6o 2011 (3,1018), seguido por BOR5 y BOR7, siendo mayor la densidad en los últimos tres muestreos (BOR8 a BOR9).

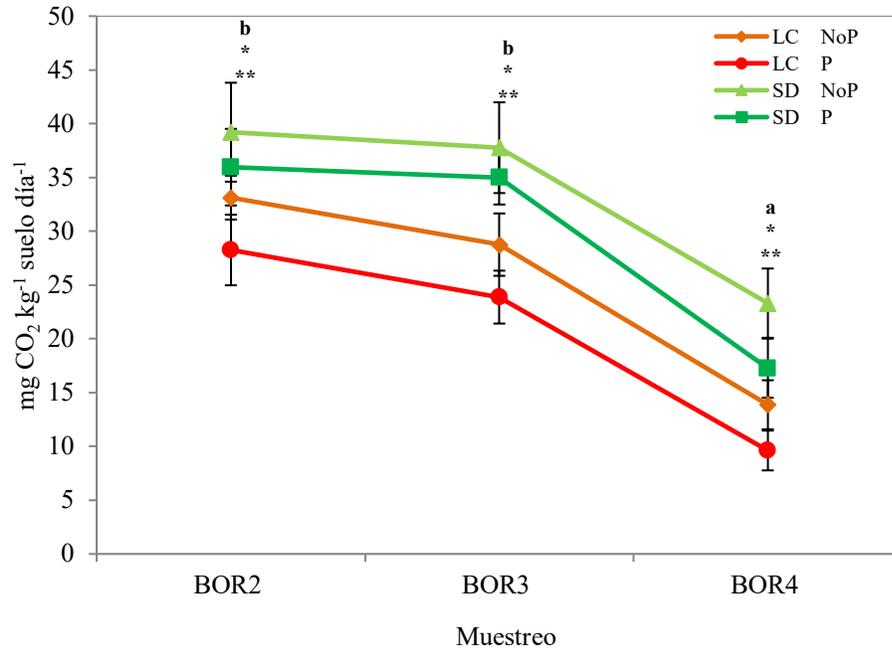
En ningún caso se observ6 diferencias significativas debido a la fertilización.

### 3.3.3.2 Respiración del suelo

#### 3.3.3.2.1 A6os 2009 y 2010

El ANOVA cuádruple realizado con los datos de respiración del suelo correspondiente a los a6os 2009 y 2010 no indica interacciones entre los factores, salvo para el caso de Fecha x Labranza, donde no se puede descartar la interacción ( $F=2,55$   $p=0,06$ ). De acuerdo al comportamiento observado se analiz6 la primera fecha (BOR1) por separado, ya que se encuentra por encima de las restantes, con una media de  $44,38 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo d}^{-1}$ . El modelo para esta fecha result6 no significativo ( $F=1,2$   $p>0,3$ ), indicando que no se hallaron diferencias para ninguno de los tratamientos.

En el análisis estadístico para BOR2, BOR3 y BOR4 no se hallaron interacciones entre las variables por lo tanto puede decirse que los factores son aditivos. Se detectaron diferencias tanto a nivel de fechas, como por el tipo de Labranza y el Manejo del Verdeo. Para el caso de las fechas se hallaron diferencias significativas entre los muestreos ( $F=33,6$   $p<0,01$ ). El test de diferencia mínima significativa de Fisher ( $\alpha=0,05$   $DMS=4,71641$ ) permiti6 observar que el último muestreo del a6o 2010 fue notablemente menor a los otros dos ( $BOR4 < BOR2 = BOR3$ ). La media observada en BOR4 fue de  $16,02 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo d}^{-1}$ , mientras que para BOR2 y BOR3 se registr6 una respiración promedio de  $34,14$  y  $31,35 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo d}^{-1}$ , respectivamente. Al mismo tiempo, se hallaron diferencias significativas debido al tipo de labranza ( $F=19,2$   $p<0,01$ ) y al manejo del verdeo ( $F=5$   $p<0,05$ ). Se observ6 a lo largo de estos tres muestreos que la respiración fue mayor en las parcelas bajo SD que bajo LC, y a su vez las parcelas No Pastoreadas mostraron siempre mayor mineralización del C que las Pastoreadas (**Figura 3.7**). No se hallaron diferencias significativas debido a las dosis de fertilización ( $F=0,49$   $p>0,60$ ).

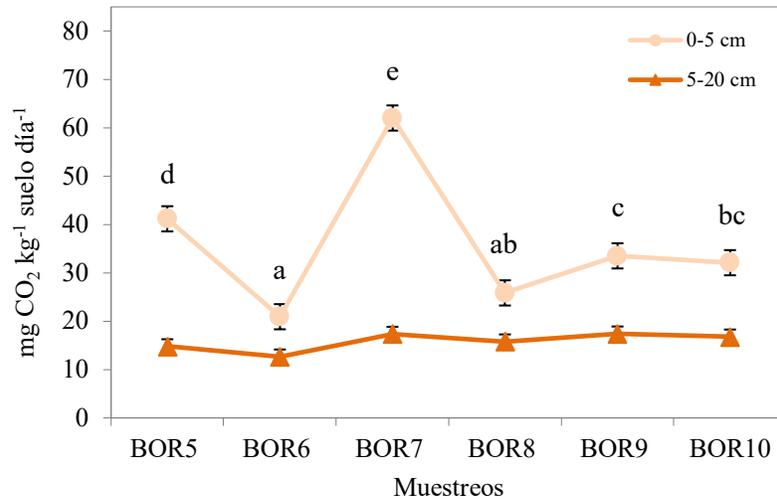


**Figura 3.7** Respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) en suelos bajo Labranza Convencional (LC) y Siembra Directa (SD), sometidos a Pastoreo directo (P) o corte mecánico del forraje (NoP), para el último muestreo del año 2009 (BOR2) y los muestreos del año 2010 (BOR3 y BOR4). Las barras de error muestran  $\pm 1$  E.S. ( $n=3$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los promedios de los laboreos (\*\*,  $p<0,01$ ) y los manejos de verdeo (\*,  $p<0,05$ ) dentro de cada muestreo.

### 3.3.3.2.2 Año 2011

La evaluación de respiración basal del suelo a dos profundidades durante el año 2011, permitió detectar en promedio para todos los tratamientos, mayor actividad de los microorganismos en los 5 cm superficiales del suelo, respecto de la profundidad 5-20 cm (**Figura 3.8**). En dos muestreos en particular, BOR5 y BOR7, se observaron mayores niveles de mineralización del C ( $41,17$  y  $62,01 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ , respectivamente).

Con el análisis estadístico de los datos obtenidos para todos los tratamientos durante los 6 muestreos del año 2011, se detectó interacción entre las labranzas y las profundidades ( $F=11,3$   $p<0,01$ ). De acuerdo a este comportamiento observado, se continuó con el análisis separando ambas profundidades (0-5 cm y 5-20 cm).



**Figura 3.8** Respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) en promedio para todos los tratamientos a dos profundidades de muestreo (0-5 cm y 5-20 cm), para las muestras tomadas durante el año 2011. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=12$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos, para cada profundidad.

#### Profundidad 0-5 cm

En los primeros 5 cm del suelo se detectó interacción de las fechas de muestreo con el laboreo ( $\text{MxL: } F=5,75 \text{ } p<0,01$ ) y el manejo del verdeo ( $\text{MxV: } F=3,3 \text{ } p<0,05$ ).

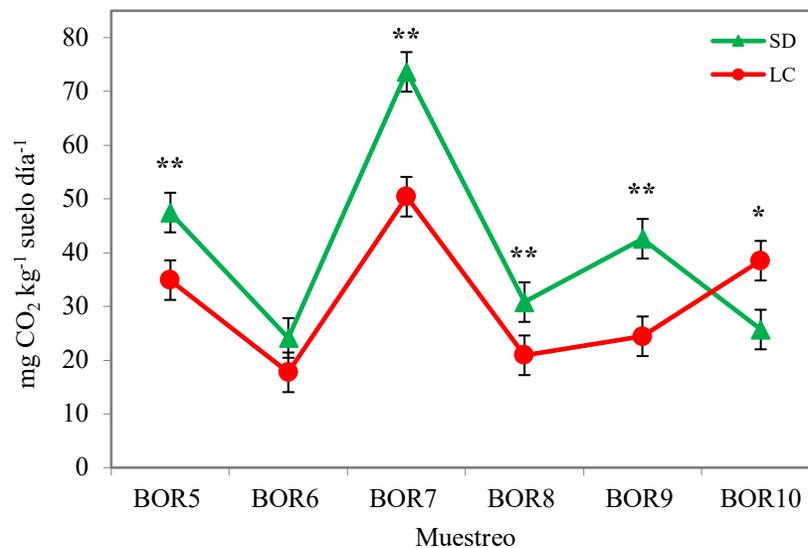
En el caso del laboreo, de BOR5 a BOR9 se registró mayor mineralización del C en las muestras bajo SD que bajo LC ( $F=36,3 \text{ } p<0,01$ ). Mientras que en la última fecha de muestreo (BOR10) se produce un comportamiento diferente de los laboreos, invirtiéndose la situación ( $F=6,04 \text{ } p<0,05$ ) (**Figura 3.9**). Se hizo un contraste de interacción que compara las diferencias antes de BOR10 contra la diferencia en la última fecha. Ese cruzamiento fue altamente significativo ( $F=1,6 \text{ } p<0,01$ ) y representó el 77% de la interacción; y el resto resultó no significativo ( $F=1,37 \text{ } p>0,05$ ). Por lo tanto con un error menor del 5% se puede afirmar que el 77% de la interacción se debe al cruzamiento que se da en la última fecha.

En el caso del manejo del verdeo, el comportamiento diferente se produjo a partir de la cuarta fecha del año 2011 (BOR8). A partir de BOR8 se estabiliza, y se registra menor mineralización del C en las parcelas P respecto a las NoP (**Figura 3.10**). Se hizo contraste de interacción para comparar las diferencias antes de BOR8 con las diferencias a partir de BOR8. El contraste indica que el comportamiento a partir de BOR8 representa el 67% de la

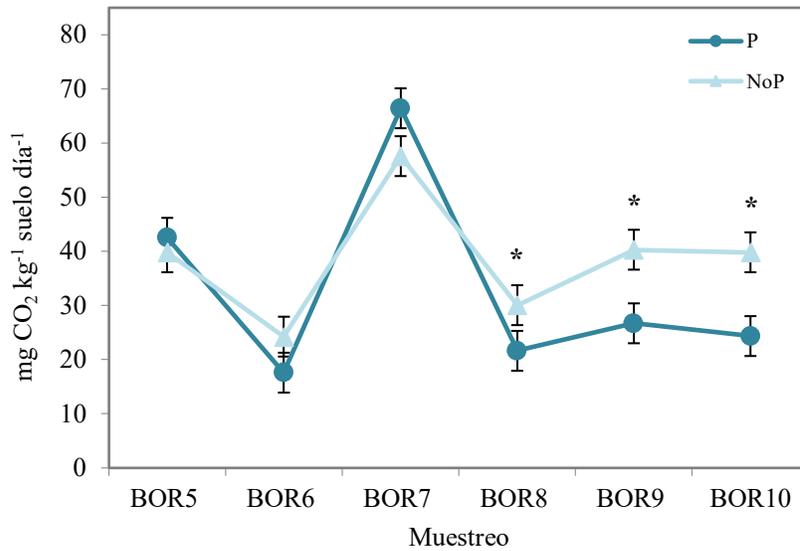
interacción ( $F=11$   $p<0,01$ ), mientras que las diferencias observadas en los muestreos anteriores no serían significativas para la interacción ( $F=1,37$   $p>0,05$ ). Esto permite indicar que un test no detectará diferencias en los primeros casos ( $F=0,29$   $p>0,05$ ), en cambio en los últimos muestreos se encuentran diferencias siendo  $NoP > P$  ( $F=17,3$   $p<0,01$ ).

### Profundidad 5-20 cm

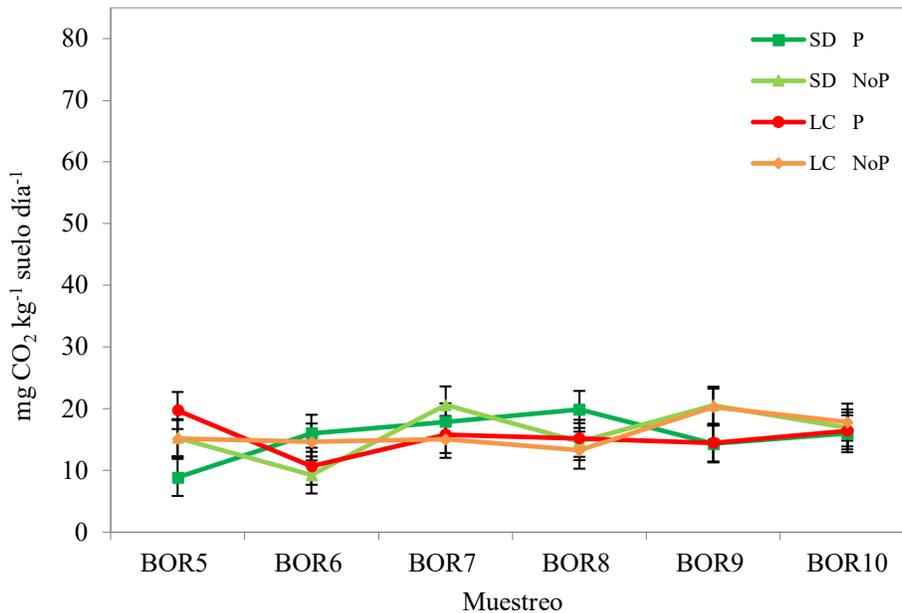
En la profundidad 5-20 cm, los resultados obtenidos en promedio para cada fecha de muestreo no superaron los  $20 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$  y no se hallaron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos ni fechas, resultando el modelo no significativo ( $F=1,05$   $p>0,40$ ) (**Figura 3.11**).



**Figura 3.9** Respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) en suelos bajo Labranza Convencional (LC) y Siembra Directa (SD), para las muestras tomadas a la profundidad de 0-5 cm durante el año 2011. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas (\*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ ) dentro de cada muestreo.



**Figura 3.10** Respiración microbiana (mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suelo día<sup>-1</sup>) en suelos sometidos a Pastoreo directo (P) o corte mecánico del forraje (NoP), para las muestras tomadas a la profundidad de 0-5 cm durante el año 2011. Las barras representan ± 1 E.S. (n=6). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas (p<0,01) dentro de cada muestreo.



**Figura 3.11** Respiración microbiana (mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suelo día<sup>-1</sup>) en suelos bajo Labranza Convencional (LC) y Siembra Directa (SD), sometidos a Pastoreo directo (P) o corte mecánico del forraje (NoP), para las muestras tomadas a la profundidad de 5-20 cm durante el año 2011. Las barras representan ± 1 E.S. (n=3).

### 3.3.4 Comunidades nitrificadoras, reductoras de nitrato y desnitrificantes

#### 3.3.4.1 Recuento de Bacterias Nitrificantes

Durante los dos primeros años se intentó determinar el NMP de bacterias nitrificantes (BN). En unos pocos tratamientos fue posible estimar el número, observándose menos de 100 microorganismos por gramo de suelo. El bajo número de microorganismos nitrificantes estuvo en el rango de 15 microorganismos por gramo de suelo en tratamientos bajo SD-P-0N, y 76 microorganismos por gramo de suelo en tratamientos bajo LC-NoP-30N.

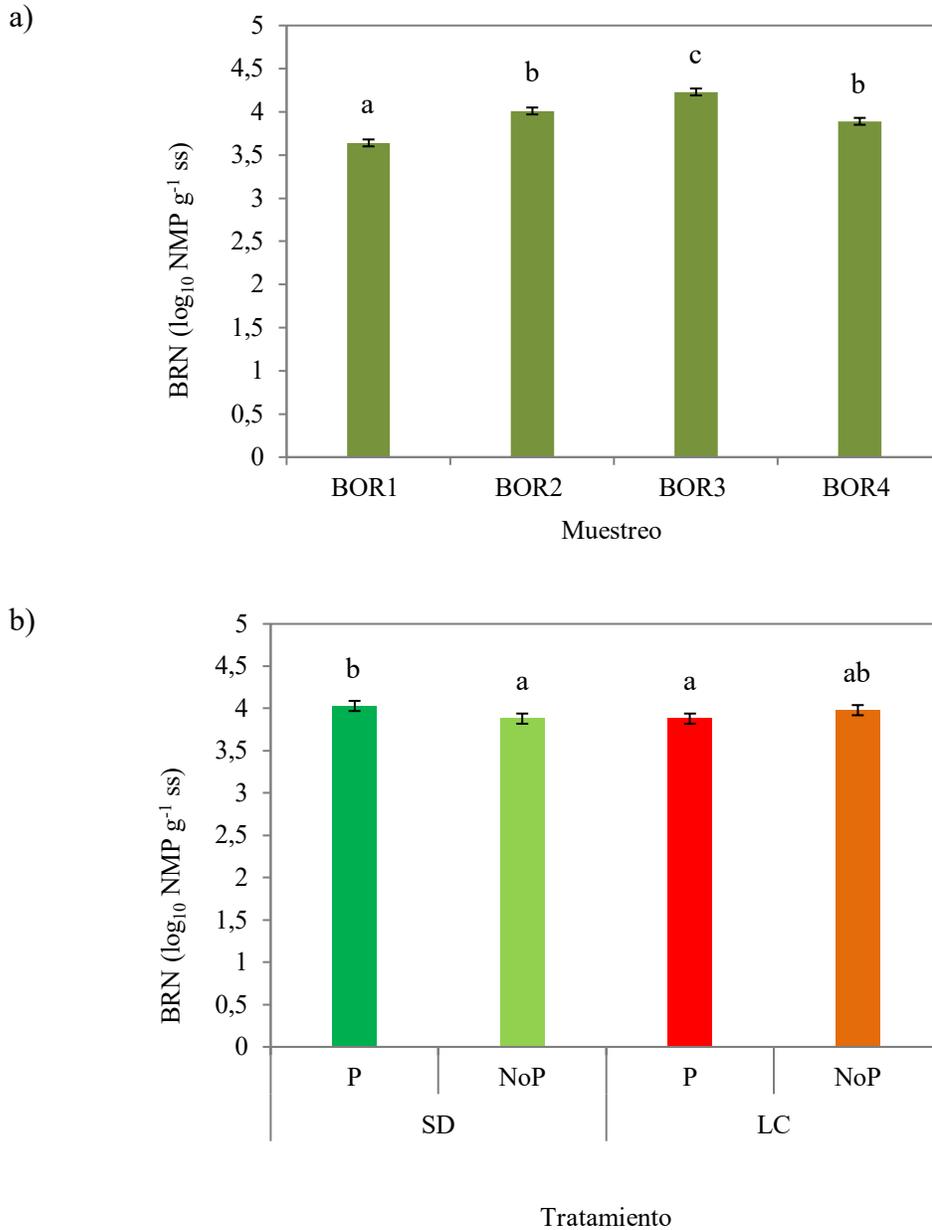
Es sabido que estos microorganismos son difíciles de cultivar, pero el hecho de haberlos detectado en algunos de los tratamientos en los primeros muestreos, indica que la técnica utilizada era correcta. Lamentablemente el número de bacterias nitrificantes se encontró en la mayoría de los casos por debajo del límite de detección.

#### 3.3.4.2 Recuento de Bacterias Reductoras de Nitrato y Desnitrificantes

##### 3.3.4.2.1 *Años 2009 y 2010*

En los datos de abundancia de BRN y BD obtenidos durante los años 2009 y 2010, no se hallaron interacciones que involucren a las fechas, pero se observaron diferencias significativas entre los diferentes momentos de muestreo (BRN:  $F=27,5$   $p<0,01$ ; BD:  $F=50,7$   $p<0,01$ ).

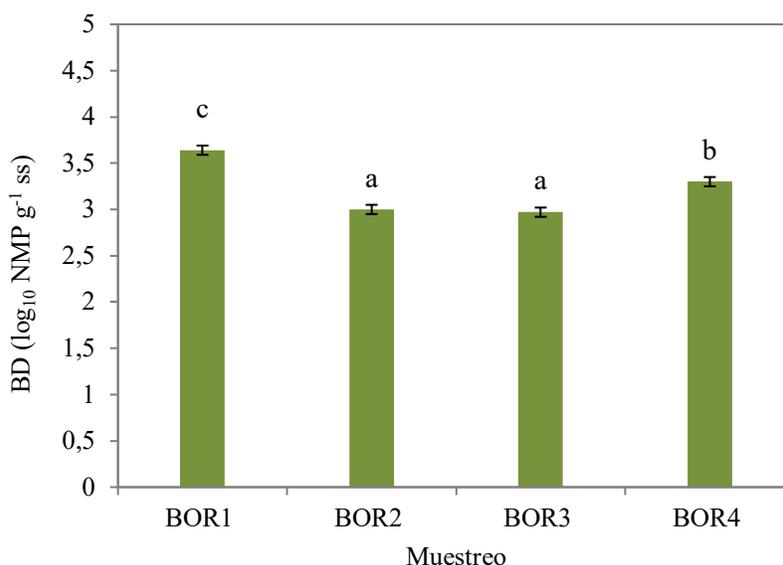
Para el caso de las BRN, el test de diferencia mínima significativa de Fisher ( $\alpha=0,05$   $DMS=0,1313$ ) arrojó que la abundancia bacteriana en el primer muestreo (BOR1) fue significativamente menor (3,64) que en los otros, mientras que el tercer muestreo (BOR3) fue significativamente mayor, superando en 0,59 unidades log al promedio de BOR1 (4,23). En el caso de los manejos, se observó una ligera diferencia para el tratamiento pastoreado bajo siembra directa en el que se observó una media superior al resto de los tratamientos (**Figura 3.12**). No se observaron diferencias significativas debido a la fertilización.



**Figura 3.12** Abundancia de Bacterias Reductoras de Nitrato (BRN), en promedio para (a) cada fecha de muestreo (BOR1, BOR2, BOR3 y BOR4); y (b) cada tratamiento (SD, siembra directa; LC, labranza convencional; P, pastoreado; NoP, No pastoreado) de los años 2009 y 2010. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=36$ ). Distintas letras representan diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre los muestreos (a) y los tratamientos (b).

La abundancia de BD varió de una fecha de muestreo a otra, siendo en este caso el promedio del primer muestreo (BOR1) (3,64) significativamente mayor al resto (2,97 – 3,3) (**Figura 3.13**).

Para ambas variables se detectaron interacciones entre los factores ( $p < 0,05$ ) en determinados muestreos, pero en el análisis individual de cada uno de ellos no se detectaron diferencias significativas en la abundancia de BRN y BD por efecto del laboreo, el manejo del verdeo o la fertilización.



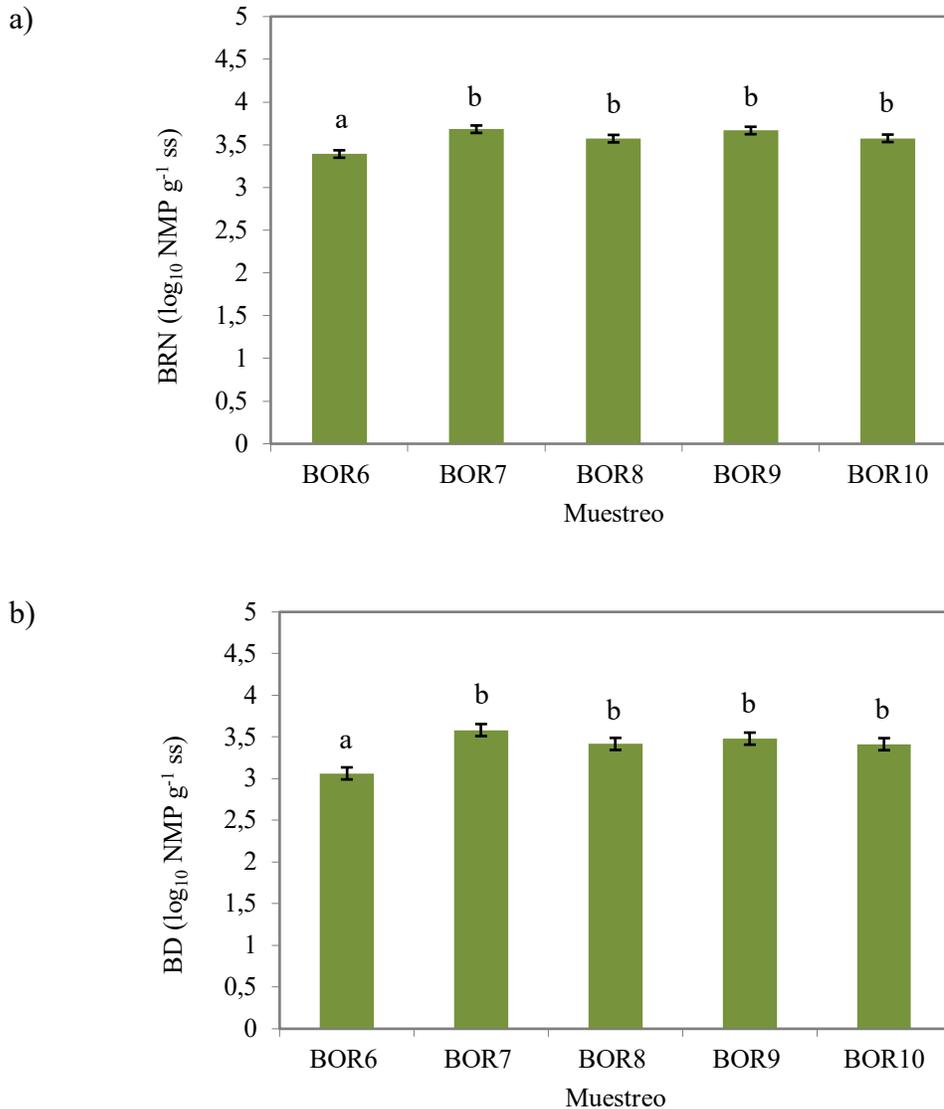
**Figura 3.13** Abundancia de Bacterias Desnitrificadoras (BD) en promedio para cada fecha de muestreo (BOR1, BOR2, BOR3 y BOR4) de los años 2009 y 2010. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. (n=36). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos.

#### 3.3.4.2.2 Año 2011

En el primer muestreo realizado durante el año 2011, no fue posible detectar bacterias reductoras de nitrato ni desnitrificantes. Resulta raro el inconveniente, por lo que posiblemente, se deba a alguna falla en el desarrollo de las tareas en el laboratorio. En las determinaciones del resto de los muestreos se obtuvieron diferentes valores de BRN y BD.

Durante el año 2011, se encontraron diferencias significativas en la abundancia de bacterias reductoras de nitrato (BRN) entre las fechas de muestreo ( $F = 7,02$   $p < 0,01$ ), sucediendo

lo mismo con las bacterias desnitrificadoras (BD) ( $F=7,34$   $p<0,01$ ) (**Figura 3.14**). Se observó que la densidad de ambos grupos microbianos fue significativamente menor en las muestras tomadas durante el muestreo BOR6, con una media de 3,3913 unidades log para las BRN y de 3,0632 unidades log para las BD, mientras que el resto de los muestreos no se diferenciaron estadísticamente y estuvieron en el rango de 3,571 - 3,6814 unidades log para las BRN, y 3,4137 - 3,583 unidades log para las BD.



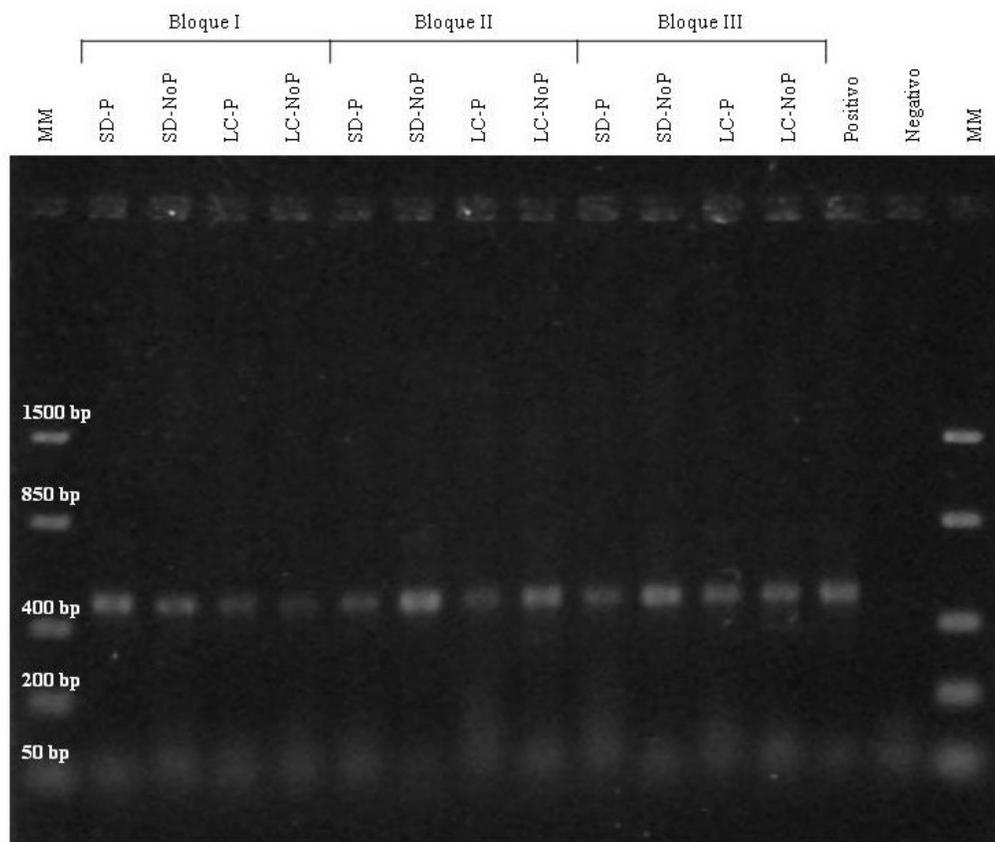
**Figura 3.14** Abundancia de Bacterias Reductoras de Nitrato (BRN) (a) y Bacterias Desnitrificadoras (BD) (b) en promedio para cada fecha de muestreo. Las barras de error representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=24$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre los muestreos.

En el caso de las BD, se encontraron interacciones entre las labranzas y el manejo de verdeo durante los muestreos BOR6 ( $F=70,7$   $p<0,05$ ) y BOR10 ( $F=16,06$   $p=0,057$ ). En BOR6 no se detectaron diferencias significativas debido a los factores evaluados por separado; mientras que en BOR10 se observó que los suelos pastoreados tuvieron en promedio menor densidad bacteriana (0,13 unidades log menos) que aquellos no pastoreados (3,48).

### 3.3.4.3 Resultados por métodos no cultivables

#### 3.3.4.3.1 *Presencia de bacterias nitrificantes*

Los estudios exploratorios a través de la PCR, permitieron corroborar la presencia del gen *amoA* de bacterias nitrificantes en el suelo. Todas las muestras de suelo analizadas de distintos tratamientos amplificaron correctamente el gen, generando un fragmento que varió entre 442,3 y 578,2 pares de bases. Las principales diferencias se encuentran entre muestreos, siendo en el muestreo BOR9 donde se amplificaron los fragmentos de mayor tamaño. Dentro de un mismo muestreo, se encontró que los fragmentos amplificados en las muestras de suelo bajo labranza convencional eran mayores que bajo siembra directa; y aquellas no pastoreadas mayores que las pastoreadas. En la **Figura 3.15** se muestra, a modo de ejemplo, la amplificación del gen *amoA* para distintas muestras de suelo en uno de los muestreos.



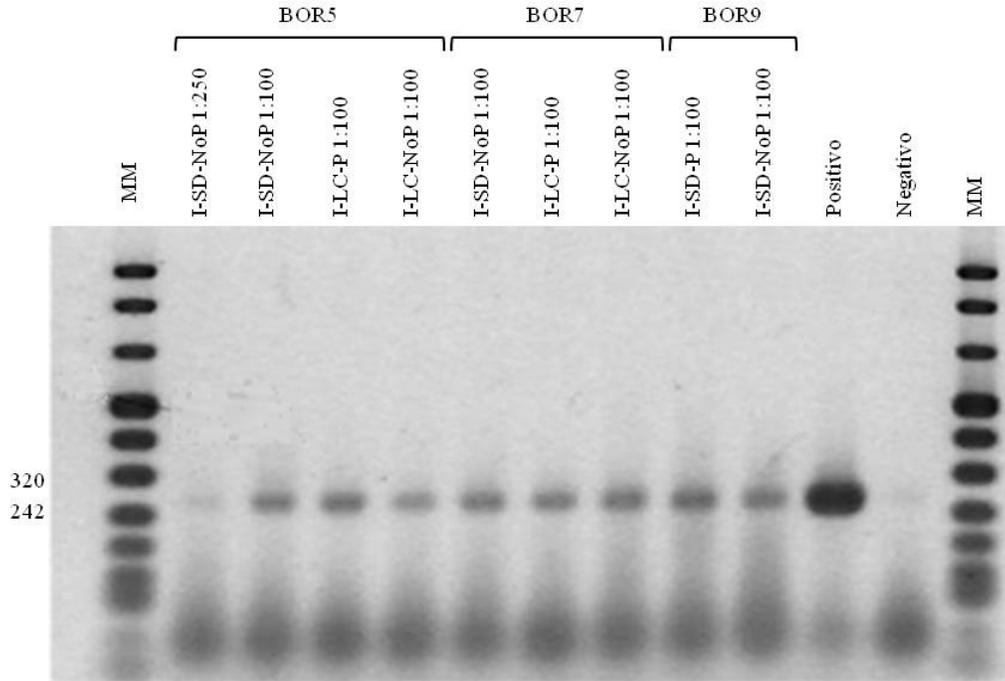
**Figura 3.15** Electroforesis en gel de los productos PCR del gen *amoA* de 12 muestras de suelo bajo distintos sistemas de manejo del quinto muestreo del año 2011 (BOR9), un control positivo y un control negativo. El tamaño de las bandas corresponde al esperado (491 bp). MM = Marcador de peso molecular (50 – 1500 bp) de Fermentas. SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado; NoP, No pastoreado.

#### 3.3.4.3.2 Presencia de bacterias reductoras de nitrato y desnitrificantes

La amplificación del gen *narG* en muestras de suelo para corroborar la presencia de bacterias capaces de reducir nitratos resultó dificultosa. Lo mismo ocurrió con los genes *nirK* / *nirS* de bacterias desnitrificantes. A pesar de los ajustes de la PCR detallados, no se logró amplificación en ninguna de las muestras evaluadas.

Respecto al gen *nosZ*, se logró amplificar en las muestras evaluadas y se observó variación en el tamaño del fragmento amplificado (263,4-304,2), como se ejemplifica en la **Figura 3.16**. Se observó un patrón de fragmentos más grandes en los tratamientos pastoreados, principalmente bajo SD. En la **Tabla 3.4** se muestran los cambios en el

tamaño del fragmento para los mismos tratamientos del bloque I en tres muestreos diferentes (BOR5, BOR7 y BOR9).



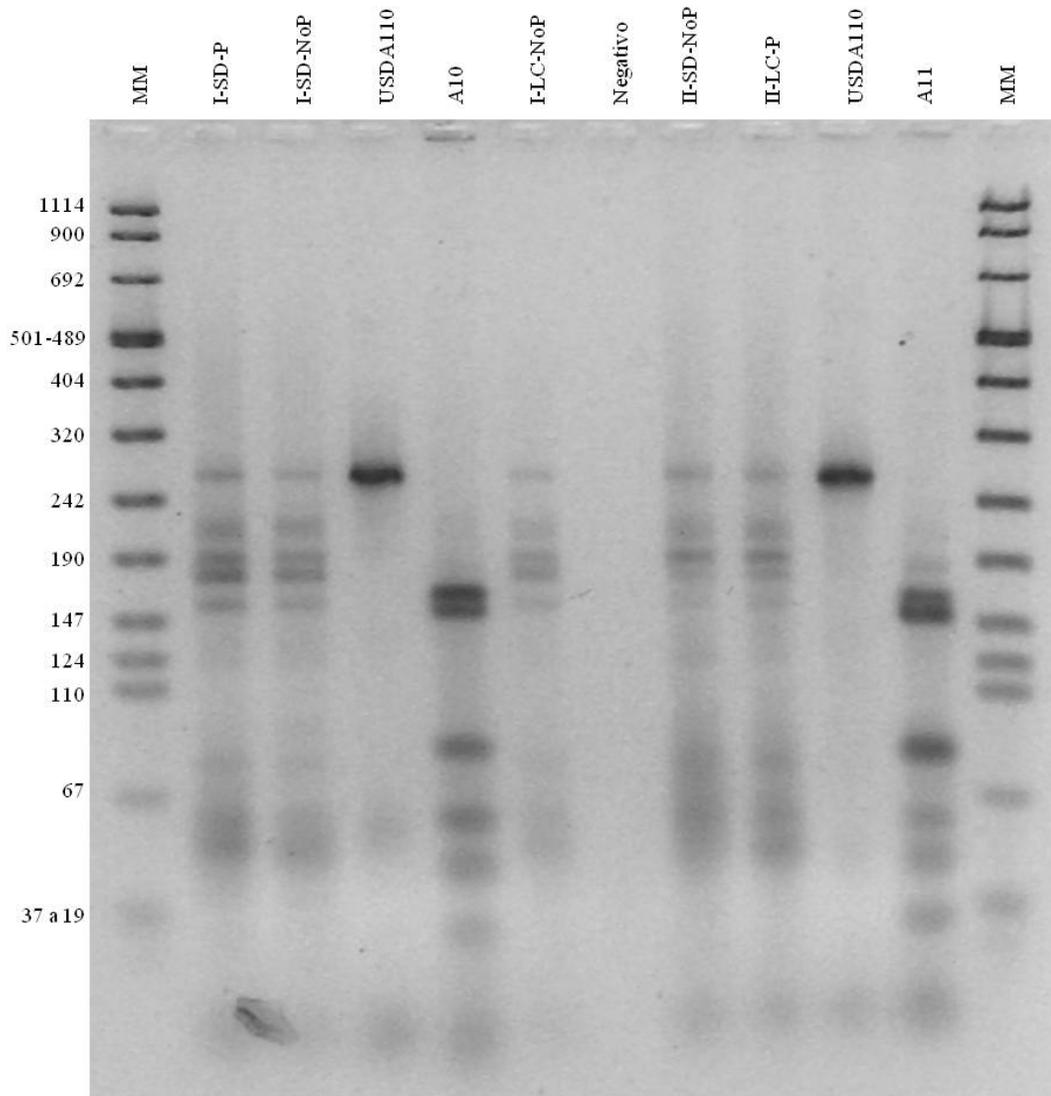
**Figura 3.16** Electroforesis en gel de diluciones (1:100 y 1:250) de los productos PCR del gen *nosZ* de muestras de suelo bajo distintos sistemas de manejo en el primer, tercer y quinto muestreo del año 2011 (BOR5, BOR7 y BOR9, respectivamente), un control positivo y un control negativo. Los fragmentos amplificaron cerca del valor esperado (267 bp). MM = Marcador de peso molecular VIII (19 – 1110 bp) de Roche. I, Bloque I; SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado; NoP, No pastoreado.

**Tabla 3.4** Tamaño de los fragmentos (bp) del gen *nosZ* amplificados en suelos bajo distintos sistemas de manejo en el primer, tercer y quinto muestreo del año 2011 (BOR5, BOR7 y BOR9, respectivamente). I, Bloque I; SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado; NoP, No pastoreado.

Tratamiento	Muestreo		
	BOR5	BOR7	BOR9
I-SD-P	296,4	304,2	268,8
I-SD-NoP	263,7	294,1	271,4
I-LC-P	288,9	304,2	269,5
I-LC-NoP	285,1	284,6	272,1

### RFLP de *nosZ*

La **Figura 3.17** muestra el perfil obtenido para las muestras analizadas, luego de la digestión de los productos amplificados por PCR del gen *nosZ*, con la enzima de restricción *Bsu*RI. A partir de la imagen se determinaron, utilizando el software correspondiente, los tamaños de los fragmentos (**Tabla 3.5**).



**Figura 3.17** Perfil de restricción con la enzima *Bsu*RI del gen *nosZ* de muestras de suelo (Bloque I: SD-P, SD-NoP y LC-NoP; Bloque II: SD-NoP, LC-P), aislamientos (A10 y A11) y *B. diazoefficiens* sp. nov. USDA110 (USDA110). MM = Marcador de peso molecular VIII (19 - 1110 bp) de Roche. SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado; NoP, No pastoreado.

**Tabla 3.5** RFLP del gen *nosZ* en cinco muestras de suelo bajo distintos sistemas de manejo (SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado, NoP, No Pastoreado), dos aislamientos desnitrificantes del mismo suelo (A10 y A11) y *B. diazoefficiens* sp. nov. USDA110 (USDA110).

Muestra	Nº bandas	Tamaños (bp)
<b>Bloque I, SD-P</b>	9	276,6; 219; 193; 181,1; 160,6; 54,49; 51,23; 49,78; 4,859
<b>Bloque I, SD-NoP</b>	5	276,6; 223,7; 195,3; 182,1; 160,6
<b>USDA110</b>	1	273,4
<b>A10</b>	6	169; 155,9; 88,77; 62,1; 49,42; 32,03
<b>Bloque I, LC-NoP</b>	5	273,4; 217,8; 193; 182,1; 159,6
<b>Bloque II, SD-NoP</b>	3	273,4; 196,5; 126,8
<b>Bloque II, LC-P</b>	7	273,4; 216,6; 194,1; 180,2; 161,5; 62,46; 53,41
<b>USDA110</b>	1	273,4
<b>A11</b>	7	187,7; 164,3; 154; 86,62; 62,1; 51,23; 34,93

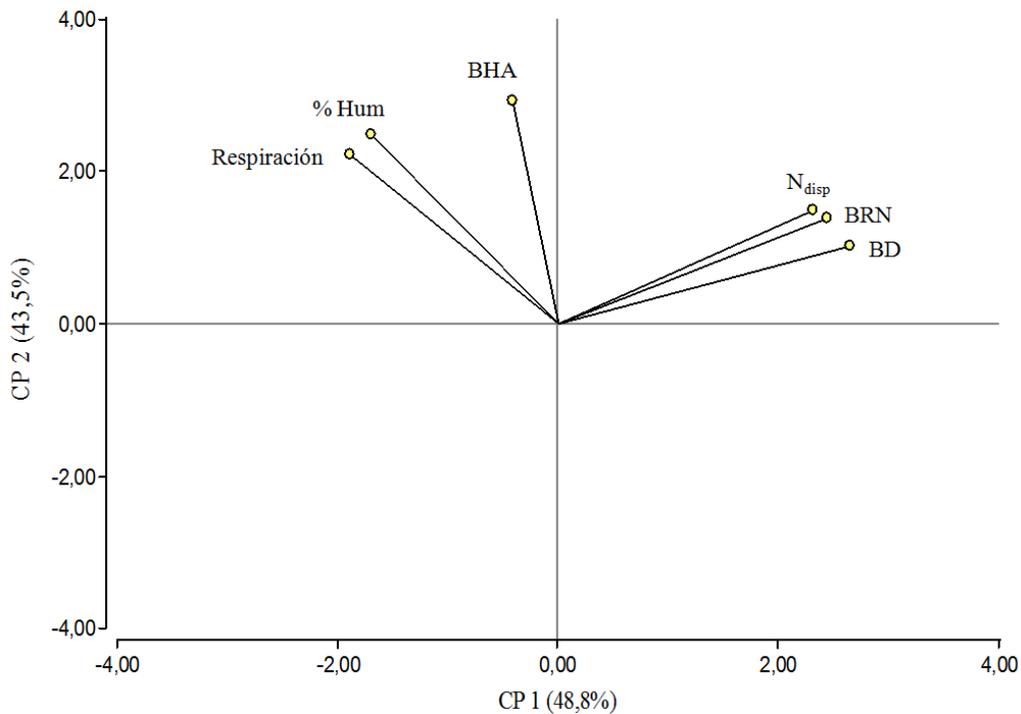
Con el software se distinguieron 9 y 7 fragmentos de restricción (FR) para las muestras pastoreadas bajo SD y LC, respectivamente. En tanto, en las muestras no pastoreadas evaluadas, se diferenciaron 5 FR para SD y LC, y una segunda muestra de SD no pastoreada, mostró un perfil de 3 FR. En este mismo estudio se incorporaron 2 aislamientos con capacidad desnitrificante, que dieron un perfil de 6 y 7 FR cada uno. Por otra parte, el producto *nosZ* de *B. diazoefficiens* sp. nov. USDA110 mostró un perfil de bandas único.

### 3.3.5 Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales incluyendo las variables  $N_{disp}$ , Porcentaje de humedad del suelo, Recuento bacteriano y Respiración del suelo, tuvo correlación cofenética elevada (0,994) considerando los dos primeros componentes, los cuáles explican el 92,3% de la variación (**Figura 3.18**). En las **Tabla 3.6** y **Tabla 3.7** se muestran las matrices de los coeficientes de correlación y las probabilidades de correlación entre las variables, respectivamente. Se observa una alta correlación positiva del porcentaje de

humedad con la respiración (0,95) y la abundancia de BHA (0,82), y de estos dos últimos entre sí (0,72). Mientras que las densidades de BRN y BD, mostraron una alta correlación positiva (0,87), y a su vez estas se correlacionaron con el nitrógeno disponible en el suelo (0,88 y 0,79, respectivamente).

El análisis realizado en base a los tratamientos (no se muestran en el gráfico), mostró para los 6 muestreos la tendencia a que las muestras tomadas a mayor profundidad (5-20 cm) se ubiquen más cerca de las variables  $N_{\text{disp}}$ , BRN y BD, para ambos sistemas de labranza. Mientras que las muestras de los primeros 5 cm del suelo se ubicaron cercanas al cuadrante superior izquierdo, mostrando mayor relación con las variables Porcentaje de Humedad, Respiración y BHA.



**Figura 3.18** Representación de las variables en el plano de las dos primeras componentes principales (92,3%) (% Hum, porcentaje de humedad en el suelo; BHA, densidad de bacterias heterótrofas aerobias; BRN, densidad de bacterias reductoras de nitrato; BD, densidad de bacterias desnitrificantes;  $N_{\text{disp}}$ , nitrógeno disponible en el suelo).

**Tabla 3.6** Matriz de coeficientes de correlación entre las variables (% Hum, porcentaje de humedad en el suelo; BHA, densidad de bacterias heterótrofas aerobias; BRN, densidad de bacterias reductoras de nitrato; BD, densidad de bacterias desnitrificantes; N<sub>disp</sub>, nitrógeno disponible en el suelo).

	% Hum	BHA	BRN	BD	Respiración	N <sub>disp</sub>
% Hum	1,00					
BHA	0,82	1,00				
BRN	-0,27	0,16	1,00			
BD	-0,15	0,38	0,87	1,00		
Respiración	0,95	0,72	-0,30	-0,26	1,00	
N <sub>disp</sub>	-0,02	0,26	0,88	0,79	-0,13	1,00

**Tabla 3.7** Matriz de probabilidades de correlación entre las variables (% Hum, porcentaje de humedad en el suelo; BHA, densidad de bacterias heterótrofas aerobias; BRN, densidad de bacterias reductoras de nitrato; BD, densidad de bacterias desnitrificantes; N<sub>disp</sub>, nitrógeno disponible en el suelo).

	% Hum	BHA	BRN	BD	Respiración	N <sub>disp</sub>
% Hum						
BHA	0,131					
BRN	0,5209	0,7080				
BD	0,7275	0,3568	0,0054			
Respiración	0,0002	0,0460	0,4732	0,5342		
N <sub>disp</sub>	0,9583	0,5405	0,0039	0,0184	0,7648	

### 3.4 Discusión

Con el fin de evaluar el efecto de diferentes sistemas de manejo agrícola en el transcurso de 3 años sobre la microbiota del suelo, específicamente aquella relacionada con el ciclo del N; se evaluó el N<sub>disp</sub> y la respiración microbiana en los suelos bajo estudio, y se realizaron recuentos bacterianos de BHA, BN, BRN y BD. Asimismo, se evaluó de modo exploratorio la presencia de las BN y BD en los suelos a través de técnicas independientes de cultivo.

Los años 2009 y 2010 tuvieron importantes déficits de agua. La escasez de lluvias estuvo acompañada por temperaturas por encima del promedio, aumentando la demanda atmosférica y agravando el impacto del déficit de lluvias. Esto limitó la recarga de agua de los suelos, y determinó un escenario de alto riesgo para los cultivos. En particular, en 2009 el cultivo de trigo se perdió, impidiendo el seguimiento del mismo en paralelo con las determinaciones biológicas; y en los años siguientes se implantó avena (2010) y, centeno consociado con vicia y sorgo forrajero (2011). Durante 2011, el aumento de lluvias mejoró notablemente la situación, registrándose un incremento en los niveles de humedad de los suelos debido a la recarga de agua en los mismos.

Las labranzas favorecen la descomposición rápida de los residuos como resultado de la mayor actividad microbiana sobre el rastrojo aireado, triturado e incorporado en el suelo. Este proceso provoca liberación de nutrientes pero también está asociado a pérdidas de C como CO<sub>2</sub> y de nitratos por lixiviación [15], por lo que se espera mayor N<sub>disp</sub> en los suelos bajo SD. En este estudio, durante los dos primeros años no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, pero se observaron diferencias en el contenido de N<sub>disp</sub> debido a la profundidad en el año 2011. En este caso, el N<sub>disp</sub> fue mayor en los 5-20 cm de profundidad. También durante el 2011 se pudo ver un efecto de los sistemas de labranza en dos momentos puntuales (BOR5 y BOR9). Lo observado fue igual para ambas profundidades. En BOR5 se observó mayor disponibilidad de nitrógeno en las parcelas bajo SD, mientras que en BOR9 se registró mayor disponibilidad en las parcelas bajo LC. Considerando el desarrollo del centeno consociado con *Vicia villosa*, y repasando los momentos en los que se hicieron los distintos manejos (**Tabla A - 4** del Anexo), se podría considerar que el mayor N<sub>disp</sub> en las parcelas bajo SD en BOR5, puede deberse a que no hubo consumo de nitrógeno por parte del cultivo en este sistema de labranza, ya que tuvo que ser resembrado debido a inconvenientes con la sembradora. Además, la fertilización al momento de la siembra puede verse reflejada en la mayor disponibilidad de nitrógeno en BOR5 respecto al resto de los momentos de muestreo.

En SD el rastrojo del cultivo anterior queda sobre el suelo. Los rastrojos sobre el suelo aportan nutrientes y la cantidad de nutrientes en tales residuos puede ser alta. Además, los rastrojos son fuente de micronutrientes que, generalmente, no se encuentran en fertilizantes tradicionales en base a N, P y K. Los residuos de cosecha de los cultivos dejados sobre la

superficie del suelo persisten por más tiempo que los residuos que son incorporados, lo que genera una disponibilidad diferencial de nutrientes, en especial del N. Los rastrojos aportados al suelo necesitan ser mineralizados para que el N y otros elementos se tornen disponibles, lo que ocurre con la actividad de los microorganismos del suelo. En SD se produce una mayor concentración de elementos nutritivos en los primeros 5 cm de suelo. La materia orgánica se acumula en la superficie del suelo, con lo que aumentan las cantidades de C y N potencialmente mineralizables en esta zona, y se incrementa la actividad microbiana que consume nutrientes, por lo que la disponibilidad de éstos inicialmente puede ser menor que la encontrada en LC [92].

Se supone que la SD favorece el desarrollo de los microorganismos en el suelo ya que produce menos disturbio, estabilizando las variaciones de temperatura debido a la presencia de residuos, conservando la humedad y proporcionando mayor disponibilidad de nutrientes a partir de la degradación de los rastrojos [23]. Se sugiere que la falta de gran perturbación en el suelo, como una labranza, proporciona una fuente constante de C que soporta altas poblaciones microbianas [93]. Sin embargo, en este trabajo no se observó en forma consistente esta situación siendo variable el efecto de los sistemas de labranza evaluados sobre la densidad microbiana del suelo.

En este estudio, se obtuvieron recuentos bacterianos de BHA muy bajos para los tres años de muestreo, siendo prácticamente similares e incluso en ocasiones menores, que las BRN y BD. En casos aislados se llegó a una densidad mayor a 4 log BHA g<sup>-1</sup> suelo. Estos resultados tan bajos, pueden adjudicarse al criterio tenido en cuenta para la determinación de las mismas, que constó en considerar la aparición de turbidez o no, como signo de presencia o ausencia de BHA, respectivamente. En otros trabajos realizados con suelos de la zona semiárida, se estimó el número de BHA, utilizando el método de diseminación en placa, arrojando valores claramente superiores a los obtenidos en este trabajo. El número promedio de UFC g<sup>-1</sup> suelo estuvo en el rango de 6,7 - 7,2 unidades de log [94, 95].

Respecto a los recuentos de BHA obtenidos durante 2009 y 2010, lo más importante durante estos dos años parece ser la diferencia que se da entre muestreos en promedio para todos los tratamientos, mostrando que claramente existe una variación en la densidad de BHA a lo largo del año, siendo menor en primavera (BOR2) que en otoño (BOR1 y BOR3) o invierno (BOR4). La menor abundancia de BHA en BOR2, podría estar relacionado con

el bajo porcentaje de humedad del suelo en ese momento. Coincidentemente, en suelos semiáridos de la región chaqueña donde se evaluó la conversión de bosques nativos a sistemas silvopastoriles, se registraron diferencias significativas en la abundancia de BHA entre estaciones, siendo mayor en verano (5,87 unidades de  $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ), y se atribuye al efecto de la estacionalidad generada por la variación de las precipitaciones y temperaturas que en esa región son mayores en verano [96].

La diferencia observada entre las labranzas en BOR1 ( $LC > SD$ ) puede ser una consecuencia de efectos acumulados a lo largo del tiempo, debido a que no se había realizado ninguna actividad de laboreo en los meses previos al ensayo; o bien podría estar relacionado con la disponibilidad de agua del período anterior.

Durante el año 2011, las diferencias observadas entre las profundidades de muestreo en BOR5, BOR6 y BOR7, siendo mayor el recuento de BHA en los primeros 5 cm del suelo, también coincide con un mayor contenido de agua a esa profundidad. En los siguientes muestreos (BOR8 a BOR10), aunque no se detectaron diferencias significativas, la abundancia bacteriana mayor en los 5-20 cm también estaría relacionada con un mayor contenido de agua.

En cuanto al manejo del verdeo, solamente en BOR7 se encontró que el número de BHA era mayor en los tratamientos donde el corte del forraje era mecánico. La menor abundancia de BHA en los tratamientos con incorporación de animales, realizado aproximadamente dos meses antes, puede deberse a una mayor compactación del suelo y por lo tanto menor disponibilidad de agua y oxígeno.

Los suelos manejados con SD suelen presentar valores de resistencias a la penetración más elevados y, en algunos casos, aumento de la densidad aparente (DA) [97]. Estudios realizados con suelos bajo SD del mismo ensayo de esta tesis, mostraron que el pisoteo animal no causa cambios en la capa superficial del suelo (0-5 cm) ni en profundidad de 15-20 cm; mientras que en las profundidades 5-10 cm y 10-15 cm, se observó un aumento de la DA. Además, el análisis del efecto del pastoreo sobre los distintos tamaños de poros, reveló que aquellos encargados de conducir el agua (macroporos), tenían una tendencia a ser menores donde hubo pisoteo, entre los 5-15 cm, mientras que no difirieron en superficie y en profundidad. Los mesoporos, aquellos que retienen el agua disponible para los cultivos, tuvieron una tendencia diferente según profundidad; siendo mayores en las

parcelas pastoreadas en los 5-10 cm, mientras que fueron menores en los 0-5 y los 15-20 cm. Pero lo más importante a destacar, es que la capacidad de almacenar agua en 0-20 cm no varió por efecto del pisoteo [16].

Para algunas bacterias de importancia ambiental, pero de muy lento crecimiento, los estudios de diversidad dependientes de cultivo pueden ser difíciles, requieren mucho tiempo [98], y los resultados pueden estar sesgados debido a la incapacidad para cultivar estos organismos [99]. En este estudio, en la mayoría de los muestreos, no fue posible determinar la abundancia de las poblaciones de bacterias nitrificadoras, ya que se encontraban por debajo del límite de detección de la técnica empleada. Es sabido que las BN son difíciles de cultivar, y la optimización de las condiciones de crecimiento es factible si se utilizan cultivos activos crecidos anteriormente o cultivos continuos, resultando muy difícil hacerlo a través de células extraídas recientemente del medio ambiente [98]. Además la baja velocidad de crecimiento de éstas, comparada con la de la mayoría de las bacterias heterótrofas, dificulta su aislamiento tanto por la lentitud de crecimiento como por la presencia frecuente de contaminantes muy relacionados morfológicamente como *Pseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, que resultan difíciles de eliminar [100].

Las técnicas moleculares no requieren cultivo, y han sido útiles en estudios de diferentes grupos de microorganismos, incluyendo bacterias oxidadoras de amonio (AOB). En este estudio se logró amplificar el gen *amoA* en las muestras de suelo, utilizando los cebadores propuestos por Rotthauwe y col. [88], incluso cuando no pudo determinarse la abundancia por métodos dependientes de cultivo. El protocolo de PCR aplicado resultó exitoso, siendo la temperatura de hibridación (60°C) altamente selectiva, demostrando la alta especificidad y sensibilidad de las técnicas moleculares. En particular para este gen, estas técnicas resultan beneficiosas ya que la secuencia de *amoA* se encuentra muy conservada [101], y ha sido amplificada tanto en suelos, como en cuerpos de agua dulce y ambientes marinos, entre otros hábitats [41]. La diferencia que se observa en los fragmentos amplificados, puede deberse a presencia de diferentes especies oxidantes de amonio, que pueden coexistir en un mismo suelo [101]. Sin embargo no pueden descartarse los sesgos de las técnicas, y/o los errores provenientes del equipamiento empleado o la forma de trabajo del investigador.

Estudios con técnicas moleculares realizados en suelos agrícolas, han demostrado que la abundancia y composición de las AOB pueden verse afectadas por los distintos manejos del suelo. Phillips y col. [102] observaron a través de PCR cuantitativa (cPCR) un aumento en el número de estos microorganismos en suelos fertilizados, efecto que no pudieron detectar por métodos tradicionales (NMP), y obtuvieron concentraciones de células oxidantes de amoníaco de 10 a 1.000 veces más altas que las obtenidas por NMP. En otro estudio se evaluaron la abundancia y expresión de genes de AOB y AOA en un ensayo a largo plazo de 30 años, bajo dos regímenes de labranza (SD y LC) y rotación de cultivos. Se encontró que, en general, la abundancia de AOB fue mayor bajo SD, sobre todo en los primeros centímetros del suelo [103]. En ensayos en los que se ha evaluado el efecto de la incorporación de animales para pastoreo, se ha observado que el pastoreo intenso puede cambiar la composición de este grupo microbiano (que a su vez está influida por cambios en las características del suelo) [104], mientras que el no pastoreo parece beneficiar el aumento de la biomasa microbiana, sin afectar su diversidad [105].

Los resultados obtenidos de densidad de BRN en los primeros dos años mostraron menor densidad en BOR1, mientras que durante el año 2011 la menor abundancia se detectó en el muestreo BOR6. Las BD tuvieron el mismo comportamiento durante 2011 que las BRN, sin embargo, en los primeros años de muestreo mostraron la mayor densidad bacteriana en BOR1. Para estos grupos bacterianos, también se vieron efectos de la incorporación de animales en algunos muestreos. Para BRN, la diferencia estuvo en los primeros años, donde se observó mayor densidad bacteriana en las parcelas bajo SD-P, mientras que las BD en el muestreo BOR10 tuvieron mayor abundancia en las parcelas NoP. Durante 2009 y 2010, las BD representaron en la mayoría de los casos menos del 20% del total de las BRN, en general por debajo de 3,4771 unidades de log bacterias  $\text{gramo}^{-1}$  de suelo. Mientras que en el año 2011, la densidad de ambos grupos tuvo fluctuaciones a lo largo de los muestreos. Las BRN estuvieron siempre en el rango de 3 – 3,8451 log, y la proporción de BD respecto a estas últimas aumentó considerablemente (más del 60% en su mayoría). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en suelos de Pergamino (Buenos Aires) y Manfredi (Córdoba) donde las BRN y las BD estuvieron siempre por debajo de 3,6021 y 3 log, respectivamente [64]. Los resultados muestran reducida abundancia de poblaciones bacterianas con las capacidades fisiológicas en estudio en comparación con lo

observado por otros autores. Gamble y col. [106] encontraron en suelos argentinos pertenecientes a la región pampeana de Balcarce y de San Pedro, una población desnitrificadora que alcanzó a  $1,6 \times 10^6$  bacterias por gramo de suelo. Asimismo, Chèneby y col. [107] trabajaron con muestras de suelo del noreste de Francia y encontraron que la población reductora de nitrato y desnitrificadora estaba en el orden del millón de bacterias por gramo de suelo. Las poblaciones de bacterias desnitrificadoras varían ampliamente de un suelo a otro, no solo dependiendo de la historia de manejo del suelo y de la composición química del mismo, sino también de los métodos de enumeración. Probablemente no todos los organismos desnitrificadores sean fácilmente cultivables, de manera que el número estimado subestimaría la población desnitrificadora, además es factible que solo los estudios in situ reflejen relaciones entre la población bacteriana con capacidad de desnitrificar y las características del ambiente [64]. Los microorganismos anaeróbicos como los desnitrificantes, se verán favorecidos por condiciones del suelos húmedo y cálido, bajo pastoreo y con aplicación de fertilizante, aunque deben darse también las condiciones anaeróbicas para que la desnitrificación ocurra. Además, este proceso puede darse en períodos cortos, algunas horas después de una lluvia, o en zonas localizadas del suelo [40].

En el estudio exploratorio a través de técnicas independientes de cultivo para evaluar las vías de la desnitrificación, no se observó alta especificidad en los cebadores utilizados. La evaluación del par de cebadores narG1960F / narG2650R dirigido al gen *narG*, no resultó efectivo para los suelos evaluados. A pesar de los ajustes de las condiciones químicas y térmicas para la PCR, no se logró amplificar. Por otra parte se evaluó la amplificación del gen *napA*, utilizando el par de cebadores napAF / napAR, con los que se ha amplificado en el laboratorio ADN de cepas bacterianas [108, 109], pero tampoco se logró amplificación. El correcto funcionamiento de los cebadores para el gen *narG* se corroboró en el laboratorio, amplificando dentro del rango de tamaño esperado en muestras provenientes de bio-reactores anaeróbicos a escala laboratorio con incorporación de residuos de cebolla, donde hay mayor cantidad y diversidad de bacterias reductoras de nitrato [110].

A pesar que Throbäck y col. [86] mostraron que los cebadores nirScd3aF / nirSR3cd detectaban fácilmente el gen *nirS* en diferentes muestras ambientales sin amplificaciones inespecíficas, en este estudio no fue exitosa la amplificación. Y en el caso del gen *nirK*, tampoco se logró la amplificación, utilizando los cebadores nirK1F / nirK5R diseñados por

Braker y col. [89]. Estos resultados pueden deberse a que el cebador *nirK1F* se une a una región del gen *nirK* que en algunas BD puede tener tres bases más, y éstas no se detectan cuando se utiliza el conjunto de cebadores mencionado; además, se han observado problemas de amplificación inespecífica con estos cebadores [111, 112]. Por otra parte, es importante realizar muestreos de suelo lo más homogéneos posibles y representativos, ya que existen patrones espaciales de las propiedades del suelo que imponen un control sobre la distribución espacial de las comunidades microbianas [113]; y pueden existir compuestos inhibidores de la PCR asociados con el ambiente del suelo (principalmente ácidos húmicos y ácidos fúlvicos) [114]. Aunque en este estudio se usó Albúmina Sérica Bovina (BSA) para mejorar el rendimiento de la reacción, estos aditivos no siempre funcionan, a veces no tienen ningún efecto o a veces incluso podrían bajar el rendimiento en lugar de aumentarlo [115]. Además, los suelos semiáridos evaluados pueden tener predominancia de bacterias Gram-positivas [94, 116]. El diseño de cebadores específicos para todas las secuencias de los genes es problemático debido a la alta diversidad taxonómica de BRN y BD, y al bajo grado de conservación de estos genes entre Proteobacteria y bacterias Gram-positivas [117]. Por último, debido al alto polimorfismo de secuencia de los genes implicados en la desnitrificación, la mayoría de los cebadores son “degenerados”, es decir que tienen un número de opciones en varias posiciones en la secuencia para permitir el alineamiento y la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas; sin embargo este puede ser otro factor que afecta la amplificación de los genes.

Respecto al gen *nosZ*, se logró la amplificación del fragmento de 267 pares de bases, utilizando los cebadores *nosZ2F* / *nosZ2R*, diseñados por Henry y col. [90]. El fragmento del amplicon, parece ser una zona muy conservada entre las bacterias desnitrificantes, sin embargo, en este estudio se encontró variación en el tamaño de las bandas y la cantidad de fragmentos obtenidos por RFLP, lo que podría indicar variación en la estructura microbiana de los suelos evaluados. El análisis de los tamaños de los fragmentos obtenidos por RFLP parece establecer diferencias entre los tratamientos. Al analizar los perfiles, considerando el tamaño total del gen (273 bp), se podría asumir que la enzima utilizada encontró amplicones con diferente secuencia, y en consecuencia cortó fragmentos de tamaño diferente. En algunos de los tratamientos evaluados se presume la presencia de genes sin cortes, con un sitio de corte, y con dos sitios de corte.

La obtención de mayor número de fragmentos de restricción en los suelos P respecto a los NoP, parece indicar que la incorporación de animales para el manejo del verdeo genera cambios estructurales en las comunidades desnitrificantes. La distribución polifilética del gen *nosZ* sugiere que la adquisición o pérdida de los genes podría estar influenciada por las condiciones ambientales en las que se encuentran [53]. Se ha observado que los suelos pastoreados tienen efectos consistentes en la actividad y estructura de las comunidades bacterianas al detectar correlaciones de la actividad enzimática con los fragmentos obtenidos por técnicas de *fingerprinting* [36]. También se ha registrado mayor abundancia del gen *nosZ* en suelos con incorporación de orina [118], y se ha demostrado que la fertilización a largo plazo con fertilizante químico y estiércol afecta tanto la abundancia como la composición de las comunidades desnitrificadoras [119].

En otros estudios con suelos anegados, la abundancia de estas comunidades microbianas no se ha visto afectada, pero si se ha encontrado cambios en la composición de las mismas [120]. Mientras que en suelos semiáridos relativamente secos, no se han encontrado efectos de diferentes sistemas de manejo sobre la abundancia del gen ni la estructura de la comunidad, lo que parece indicar la presencia de comunidades relativamente estables [121].

Las BD conforman un grupo muy diverso, y en consecuencia la variedad de cebadores existentes es muy amplia [53]. Por lo tanto la selección correcta de cebadores es esencial para lograr una buena amplificación, sobre todo en tipos de suelos que nunca se han estudiado. Los estudios de suelos basados en PCR, deben ser optimizados y adaptados a cada tipo de suelo, para disminuir los factores inhibitorios de la reacción, y al mismo tiempo aumentar la sensibilidad y especificidad.

Para mejorar la amplificación y obtener resultados positivos más rápidamente, se sugiere la utilización de un par de cebadores que generen un fragmento de mayor tamaño, como *nosZF* / *nosZR* [122] o *nosZ1622R* que funcionan bien en suelos y otros ambientes [86]. La utilización de otras técnicas como PCR-DGGE, podrían mejorar la eficiencia y clarificar la estructura de las comunidades en las muestras de suelo.

La supervivencia de los microorganismos del suelo varía en respuesta al potencial de agua del suelo; aunque se sugiere que en las regiones semiáridas, donde la falta de humedad es una ocurrencia común, la comunidad microbiana estaría pre-adaptada a las fluctuaciones en la disponibilidad de agua. La respuesta de los microorganismos a los eventos de lluvias

esporádicos y la consecuente disminución de agua disponible en el suelo, varía con el taxón. Sin embargo, es probable que una proporción menor de la comunidad microbiana esté activa bajo esas condiciones [123] e incluso bajo estrés hídrico severo, los microbios que sobreviven se encuentran en un estado de “alerta metabólica” [124]. La adaptación de las bacterias se expresa a través de diferentes estrategias de vida bacterianas, confiriendo una capacidad de recuperación de las comunidades bacterianas potencialmente activas [125]. Los cambios en los niveles de humedad del suelo, provocan una disminución en el potencial osmótico de los microorganismos [126]. El secado rápido y re-humectación de los suelos puede aumentar la disponibilidad de sustratos orgánicos lábiles a través de la muerte microbiana y la lisis celular o mediante la desestabilización de los agregados del suelo, por lo que la materia orgánica del suelo protegida físicamente queda accesible para los microorganismos que sobrevivieron tales condiciones [124, 127].

Según los resultados de esta tesis, la respiración microbiana tuvo una clara respuesta al laboreo realizado en los tres años de muestreo, observándose mayor respiración en los tratamientos bajo SD. Asimismo durante los años 2009 y 2010, y en las muestras de los primeros 5 cm superficiales del suelo muestreados en 2011, la respiración microbiana fue significativamente mayor en los tratamientos que no tuvieron incorporación de animales para pastoreo. Los porcentajes de humedad de los muestreos del 2011 mostraron mayor disponibilidad de agua en los suelos NoP, y se observó para ambos sistemas de labranza que el agua no queda en la capa superficial, siendo la LC la que mayor contenido de agua en lámina tenía. Los resultados parecen razonables, si se considera que los suelos NoP sufrirán menor compactación [16] y que en la superficie del suelo habrá mayor disponibilidad de oxígeno, posibilitando un mayor desarrollo de microorganismos aerobios, y en consecuencia mayor actividad microbiana.

La mayor actividad microbiana en las parcelas bajo SD, puede deberse a que las labranzas conservacionistas, especialmente la SD, acumulan materia orgánica en los primeros centímetros del perfil del suelo, factor que parece ser el más estimulante para la actividad biológica [128]. La fracción lábil de la materia orgánica es una fracción muy dinámica y una importante fuente de C en el suelo que puede aumentar significativamente bajo sistemas de SD [93], y la respiración del suelo se relaciona con la disponibilidad de carbono en la biomasa, y es generalmente más alta en la superficie del suelo bajo SD

debido a la mayor actividad biológica. Una mayor producción de C-CO<sub>2</sub> se ha registrado en campos bajo SD que bajo LC. En cambio, en sistemas de LC la materia orgánica se distribuye de manera más uniforme dentro de la capa arada, y debido a que tienen menor contenido de carbono orgánico, a veces pueden generar mayores cantidades de C-CO<sub>2</sub> y sostener una biomasa microbiana con un cociente metabólico más alto (respiración basal / biomasa) que los suelos no arados. Estos resultados pueden darse por la diferente accesibilidad de los microorganismos al sustrato de carbono o debido a cambios metabólicos [129].

Los “ciclos secos-húmedos” también pueden afectar los procesos microbianos [130]. Estos eventos son especialmente importantes en ambientes áridos y semiáridos, pero la mayoría de los suelos superficiales experimentarán fluctuaciones estacionales en el contenido de humedad [127]. La respiración heterotrófica en suelos aumenta con el incremento de la humedad del suelo [124] y la temperatura [131], ya que bacterias y hongos son capaces de activarse mineralizando los constituyentes orgánicos puestos a disposición por las condiciones de sequía prolongados y el rápido re-humedecimiento, y por eso es posible observar impulsos en los flujos de CO<sub>2</sub> después de un evento de ingreso de agua [125] o en los meses más cálidos del año. Los resultados de respiración obtenidos en este estudio durante 2011, mostraron claramente la diferencia entre los dos estratos evaluados, siendo los suelos superficiales (0-5 cm) los que tuvieron mayor respiración microbiana. Además, los suelos que tuvieron ingreso de agua entre 5-7 días antes del muestreo (como BOR7 y BOR9), registraron un aumento de la actividad biológica, específicamente en los 5 cm superficiales y para ambos sistemas de labranza. Mientras que los suelos muestreados que no recibían agua desde al menos 20 días antes (BOR6 y BOR8), disminuyeron drásticamente la actividad biológica. Esto también concuerda con el porcentaje de humedad de los suelos muestreados, donde 2011 fue claramente más húmedo que 2009 y 2010, y eso se vio reflejado tanto en la respiración como en la densidad microbiana. Los valores de respiración microbiana (mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suelo día<sup>-1</sup>) en el suelo superficial, estuvieron en un rango bastante amplio (15-78), aunque la mayoría de los suelos bajo buenas condiciones de humedad estuvieron en el rango de 50-60. Estos datos se aproximan a aquellos observados por otros autores, tanto en suelos del mismo lugar (Bordenave) (≈40) [95], como en un suelo arenoso franco de la zona rural aledaña a Bahía Blanca (≈70) [132], y suelos agrícolas

de Río Cuarto ( $\approx 50$ ) [133]. A su vez, los valores más bajos de respiración (entre 15 y 30) fueron similares a los valores medios informados por Silberman [96] para bosques nativos (24,89) y sistemas silvo pastoriles (16,64 – 21,88) en suelos semiáridos de Chaco. Por otra parte, debido a las bajas densidades bacterianas registradas en esta tesis, se asume que la respiración microbiana registrada está dada también por microorganismos no evaluados, como pueden ser hongos, o bacterias pertenecientes al grupo de los actinomicetes, que son muy abundantes y activos en el suelo [100].

Por otra parte, el ingreso de nitrógeno al suelo por orina de animales incorporados para pastoreo, puede inducir estrés microbiano [134], mientras que la aplicación de fertilizantes y/o herbicidas al suelo puede provocar aumento o inhibición transitorios de la actividad microbiana. La respiración microbiana puede verse reducida por aplicación de metsulfurón-metil, mientras que con el agregado de 2,4-D y Glifosato se han observado efectos agudos, aunque transitorios y reversibles [95]. Según los resultados de esta tesis, se puede considerar que la prominente disminución de la respiración en BOR8 puede deberse a la incorporación de animales en las parcelas pastoreadas y a la aplicación de herbicida (glifosato + 2,4-D) en las parcelas no pastoreadas, teniendo mayor impacto el pastoreo sobre la respiración microbiana.

El análisis de componentes principales de las variables, utilizando todos los datos del año 2011 para los suelos evaluados, mostró la alta correlación positiva que existe entre la respiración microbiana y el porcentaje de humedad del suelo, y de estas variables con la abundancia de BHA. Mientras que, tal como se esperaba, las BRN y BD se correlacionaron positivamente entre sí y con el  $N_{\text{disp}}$ . Las condiciones climáticas pueden llegar a enmascarar las variaciones en la biomasa y actividad microbiana, particularmente cuando están asociadas a cambios en la disponibilidad y localización del sustrato como es el caso de la incorporación por laboreo o lavado a partir de la cobertura. La humedad, la temperatura y la disponibilidad de sustrato son los principales factores ambientales que controlan la actividad microbiana en el suelo.

En concordancia con otros autores, los resultados obtenidos parecen mostrar que el contenido de nitrógeno y la biomasa y respiración microbianas son variables dependientes de las condiciones ambientales, lo que genera variabilidad entre las fechas de muestreos, y diferencias en el efecto de los sistemas de labranza [15, 135–138]. Esta relación también se

da en la productividad de los cultivos. En particular, en los suelos semiáridos evaluados, se determinó que el rendimiento de trigo está estrechamente relacionado con las lluvias, y que existe una interacción permanente de los efectos de los sistemas de labranza y de nitrógeno, entre sí y con el clima [65].

### 3.5 Conclusión

A pesar de la larga historia del ensayo, los datos obtenidos con las variables evaluadas en este estudio no muestran resultados contundentes en respuesta al sistema de manejo empleado.

La actividad microbiana medida a través de la respiración, y en menor medida el recuento bacteriano, resultaron sensibles al evaluar el efecto del manejo de verdeo, indicando que la incorporación de ganado en estos suelos, puede disminuir la actividad biológica y la microbiota heterotrófica, y aumentar la densidad de BRN y BD, provocando pérdidas de nitrógeno.

La actividad microbiana, mostró una tendencia clara indicando que los suelos que no reciben perturbación por labranzas y a los que no se les incorporan animales para pastoreo, muestran mayor actividad, lo cual parece estar relacionado con la mayor disponibilidad de formas lábiles de carbono.

Las técnicas moleculares permitieron confirmar la presencia de AOB amplificando el gen de función *amoA*, el cual resultó de menor complejidad para su amplificación que el gen *nosZ* de bacterias desnitrificantes. Para ambos genes se observó variación en el tamaño de los fragmentos amplificados. El estudio por RFLP permitió deducir la presencia de cepas desnitrificantes con secuencia variada en los suelos semiáridos, en especial cuando se cambia el manejo del verdeo.

# CAPÍTULO 4

## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DESNITRIFICANTE

### 4.1 Introducción

Las bacterias desnitrificantes son organismos básicamente aeróbicos, heterótrofos, que poseen la capacidad alternativa de reducir óxidos de N cuando el oxígeno es un factor limitante del desarrollo [54], y son frecuentemente aisladas de sedimentos, del suelo y de ambientes acuáticos [107].

Aunque los desnitrificantes más comunes en la naturaleza son las especies del género *Pseudomonas* seguidas de los organismos del género *Alcaligenes*, estrechamente relacionado con el primero, esta alternativa a los procesos de respiración, se ha observado en más de 50 géneros [37], y por lo tanto no se puede asociar a grupos taxonómicos específicos. La desnitrificación se ha descrito en Firmicutes [139], Actinobacteria [107, 140], Proteobacteria [106], también en Archaea [141], y aún en hongos [142]. Por lo tanto, los desnitrificantes están implicados en muchas otras funciones diferentes de importancia en los ecosistemas, por ejemplo, la fijación de nitrógeno (*Rhizobium* y *Azospirillum*) y la oxidación de amoníaco (*Nitrosomonas*). Ciertas bacterias desnitrificantes son quimioautotróficas (*Thiobacillus* y *Paracoccus*) o fototróficas (*Rhodobacter*), mientras que algunas son patógenas para las plantas, animales y seres humanos (*Agrobacterium*, *Alcaligenes* y *Campylobacter*) [39].

Antes del surgimiento de las técnicas moleculares, decir que una bacteria era desnitrificadora implicaba probar su capacidad de crecer bajo condiciones limitantes de O<sub>2</sub>

y con nitrato como aceptor terminal [143]. Como consecuencia, casi todas las bacterias que mostraban un buen crecimiento bajo esas condiciones fueron caracterizadas como desnitrificantes completas. Sin embargo, con el análisis del genoma se pudieron identificar tanto bacterias desnitrificantes completas (presencia de los genes implicados en todos los pasos de la desnitrificación) como parciales (presencia de algunos genes), permitiendo una evaluación más precisa de la distribución filogenética real de los genes de desnitrificación [52].

Actualmente, las técnicas de biología molecular para el estudio de la ecología de bacterias desnitrificantes se basan en el uso de los genes funcionales o enzimas implicadas en la ruta de desnitrificación [144, 145], y permiten evaluar la diversidad en los genes de función, así como secuenciar e identificar aislamientos. La diversidad de los genes, conduce a que dos microorganismos difieran en tan solo un paso de la desnitrificación, ya sea por presencia / ausencia del gen o por la presencia de distintos genes para un mismo paso.

El carbono es un elemento clave que rige el crecimiento microbiano en el suelo, y los aspectos funcionales relacionados con la utilización de sustratos pueden proporcionar información importante más allá de la proporcionada por las investigaciones a nivel taxonómico o investigaciones estructurales basadas en el análisis de rRNA. La diversidad funcional de los microorganismos, en particular tal como se define para los sustratos utilizados en el metabolismo energético, es integral a la comprensión de la biogeoquímica. De hecho, se ha argumentado que es la diversidad a nivel funcional más que a nivel taxonómico la que es crucial para la estabilidad a largo plazo de un ecosistema (Insam y Goberna, 2013).

Garland y Mills [29] desarrollaron un método rápido de *Perfil Fisiológico a Nivel de Comunidad (CLPP)*, por sus siglas en inglés). Este análisis de la estructura de la comunidad microbiana basado en la utilización de sustratos carbonados (SC), requiere múltiples y rápidos ensayos de utilización de la fuente de carbono. BIOLOG, Inc. desarrolló una técnica basada en reacciones redox, para la prueba de utilización de SC de muestras ambientales o aislamientos bacterianos para la identificación de cepas [146]. El método implica la inoculación directa en microplacas (que contienen diferentes fuentes de C, nutrientes, y un colorante redox), la incubación y la detección por espectrometría de la

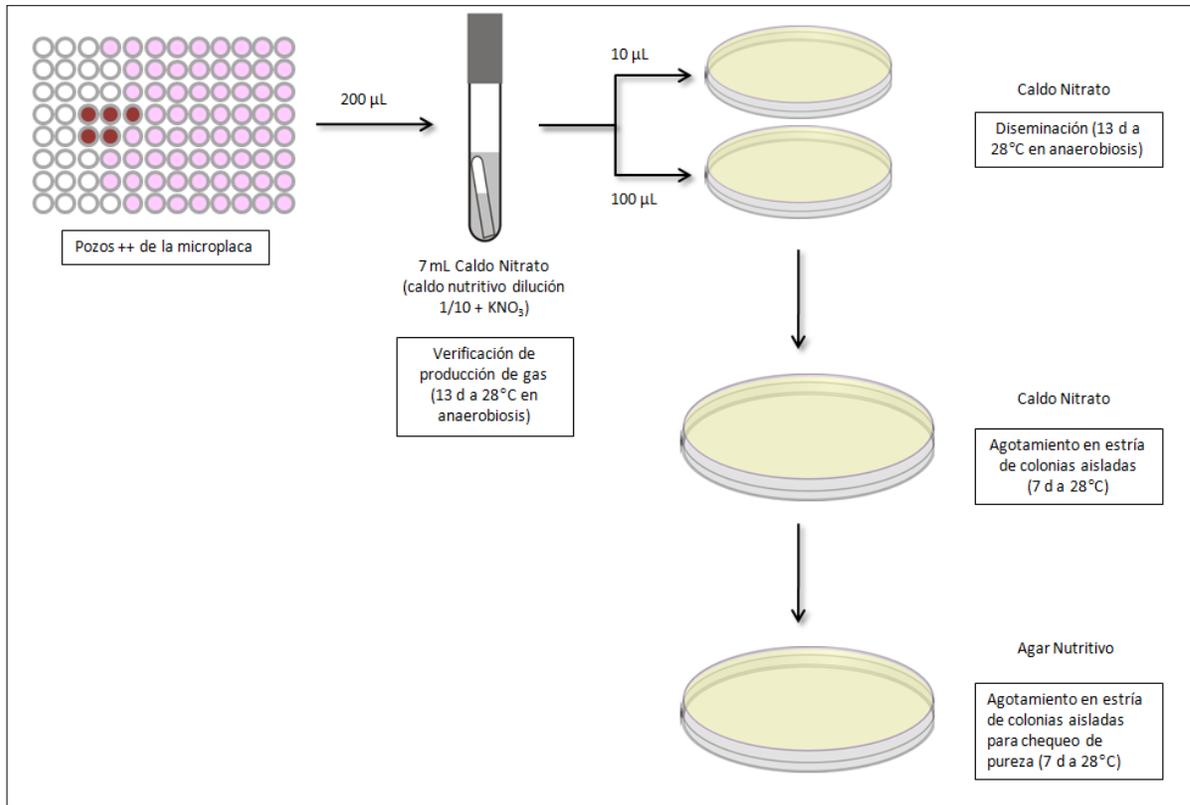
actividad microbiana heterotrófica. La simplicidad y la velocidad de análisis son atractivos para el ecólogo microbiano, pero la técnica requiere la adquisición cuidadosa de datos, análisis e interpretación [46].

Para evaluar si el laboreo y el pastoreo afectan la diversidad de bacterias potencialmente desnitrificadoras, se planteó como actividades: aislar y caracterizar bacterias con características desnitrificantes de suelos con diferentes sistemas de manejo; describir la diversidad de los aislamientos en base al patrón de utilización de sustratos carbonados; e identificar taxonómicamente aislamientos particulares.

## 4.2 Materiales y Métodos

### 4.2.1 Obtención de Aislamientos

Una vez realizada la determinación del NMP de bacterias desnitrificantes en suelo en los muestreos BOR5, BOR7 y BOR9 del año 2011 (**Capítulo 3**), las microplacas no fueron descartadas sino que se continuó con el proceso de aislamiento a partir de las mismas (**Figura 4.1**). Se extrajo el volumen de líquido contenido en los pozos ++ donde se asumía la presencia de bacterias desnitrificadoras (aquellos donde no se detectó nitrato ni nitrito), juntando las diluciones de un mismo tratamiento y se procedió a la verificación de producción de gas. Para esto se prepararon tubos con campana Durham invertida y 7 mL de Caldo Nitrato, medio selectivo para desnitrificadoras preparado con Caldo Nutritivo (Britania, Argentina) diluido 1/10 (0,8 g L<sup>-1</sup>) y KNO<sub>3</sub> (0,2 g L<sup>-1</sup>). Los tubos se incubaron a 28°C por 13 días en jarra de anaerobiosis con el sistema anaeróbico GasPak (BBL, USA). Luego, se registró la presencia (tubos positivos) o ausencia (tubos negativos) de burbujas de gases de nitrógeno [54]. A partir de los tubos positivos, se realizó una siembra en superficie por diseminación en medio sólido bajo condiciones anaeróbicas. Por cada tubo se sembraron cajas con diferente volumen de inóculo (10 y 100 µL), debido a que se desconocía la concentración bacteriana del mismo. A partir de las cajas en las que se observó desarrollo, se realizó el aislamiento por agotamiento en estría en medio sólido. Luego de verificar la pureza de las mismas, las colonias desnitrificantes aisladas se repicaron en Agar Nutritivo (AN). Los aislamientos se conservaron a 4 °C para su posterior caracterización molecular.



**Figura 4.1** Procedimiento seguido para aislamiento de bacterias desnitrificantes del suelo.

## 4.2.2 Caracterización molecular de los aislamientos

### Extracción de ADN

Los aislamientos y 2 bacterias de referencia (*Alcaligenes faecalis* NRRL B-170 y *Pseudomonas aeruginosa* NRRL B-771, cortesía de ARS Culture Collection, USDA) fueron cultivados a 28°C por 4 días en Triptona Glucosa Levadura, con la siguiente composición (g L<sup>-1</sup>): triptona, 5; extracto de levadura, 5; glucosa, 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1. Se centrifugaron alícuotas de los cultivos (2 mL por 10 min a 12500 rpm) y el sedimento de células se empleó para la extracción de ADN. Se usó el kit de extracción Ultra Clean DNA (MoBio Laboratories, CA, EEUU) para extraer el ADN total, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Evaluación del gen 16S y 16S-23S ITS

Para la amplificación del ADN Ribosómico (ADNr) 16S y del Espacio Interno Transcrito (ITS) de las secuencias ribosomales del ADN (ITS-rDNA) se utilizaron

protocolos adaptados en el laboratorio [95]. Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador térmico (Bioer Life Express), con las condiciones descritas en la **Tabla 4.1**. Una alícuota de 4  $\mu\text{L}$  del producto de reacción se sembró en un gel de agarosa (Conda) al 1% en tampón TAE y se separaron por electroforesis (80 V, 60 min). En las calles laterales del gel se sembró el marcador de peso molecular Fast Ruler DNA Ladder Low Range (Fermentas, Canadá). La mezcla de reacción para la PCR se preparó con 0,125  $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa Taq, 2,5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X, 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM y 2,5  $\mu\text{L}$  de solución de dNTP (2 mM) (Inbio-Highway, Argentina), 0,125  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cebadores (100 mM), y completando el volumen hasta 22,5  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas. Luego se agregó una alícuota de 2,5  $\mu\text{L}$  de ADN bacteriano, obteniendo un volumen final de reacción de 25  $\mu\text{L}$ .

**Tabla 4.1** Condiciones de PCR para la amplificación de ADN<sub>r</sub> 16S e ITS.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Origen	Condiciones térmicas <sup>a</sup>
<b>16S</b>			
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane [147]	1 ciclo (D): 3 min 95°C
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		35 ciclos: 1 min 94°C (D), 1 min 55°C (H), 1 min 30 s 72°C (P)  1 ciclo (P): 10 min 72°C
<b>ITS</b>			
72F	TGCGGCTGGATCACCTCCTT	Gürtler y Stanisich	1 ciclo (D): 5 min 95°C
38R	CCGGGTTTCCCCATTCGG	[148]	35 ciclos: 1 min 94°C (D), 1 min 30 s 55°C (H), 1 min 30 s 74°C (P)  1 ciclo (P): 5 min 74°C

<sup>a</sup> D = desnaturalización, H = hibridación, P = polimerización

Y(C/T), M (C/A)

### **Evaluación de los genes de desnitrificación**

La capacidad de desnitrificación de los aislamientos obtenidos se analizó evaluando la presencia de los genes de función *nirK* y *nosZ*. Los cebadores utilizados, la mezcla de reacción, las condiciones térmicas y el control positivo, son los mismos que se utilizaron para el estudio de comunidades (**Capítulo 3**). El producto PCR (4  $\mu$ L) se sembró en un gel de agarosa (Conda) al 2% en tampón TAE, y en las calles laterales se sembró el marcador de peso molecular Fast Ruler DNA Ladder Low Range (0,1 Kb) (Fermentas, Canadá).

Todos los geles se tiñeron con Gel Red y se fotografiaron en un transiluminador UV TFX 20-M (Life Technologies Corp., Rockville, MD, EEUU). Las imágenes se analizaron con el software Kodak Digital Science Image Analysis, versión 3.0 (Eastman Kodak Company, NY, EEUU).

#### **4.2.3 Caracterización fisiológica de los aislamientos**

A partir de los resultados del apartado **4.2.2**, se continuó trabajando solo con los aislamientos en los que se confirmó la presencia de los genes *nirK* y *nosZ*, que junto con el desarrollo bajo condiciones anaeróbicas y la producción de gas, permiten asumir la presencia de cepas desnitrificadoras. Para caracterizar fisiológicamente a las cepas se evaluó el desarrollo y la capacidad para metabolizar diferentes SC.

#### **Curvas de crecimiento**

Para realizar las curvas de crecimiento, se prepararon Erlenmeyers de 100 mL con 25 mL de caldo nutritivo líquido. Éstos se inocularon con cultivos nuevos de cada uno de los aislamientos con aproximadamente  $10^6$  UFC / mL ( $DO_{620} = 0,5$ ), y fueron incubados a 28 °C en estufa. Se determinó  $DO_{620}$  de los cultivos cada 12 horas durante 4 días, utilizando un espectrofotómetro (Metrolab 1600 DR).

#### **Utilización de sustratos carbonados**

Para estudiar la capacidad de los aislamientos de usar diferentes SC, se prepararon manualmente microplacas de 96 pozos divididas en tres, para cargar tres cepas por microplaca, y 31 SC (**Tabla 4.2**) por cada división. El pocillo restante de cada división no

llevaba SC y fue utilizado como blanco. Se evaluaron 32 aislamientos; 4 cepas testigo con capacidad desnitrificante total: *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. USDA110 (USDA110) y *B. japonicum* USDA 122 (USDA122); y 1 cepa testigo productora de N<sub>2</sub>O, *B. japonicum* USDA 6 (USDA6).

Las microplacas fueron cargadas con 225 µL de medio mínimo (MM) con la siguiente composición (g L<sup>-1</sup>): NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25; KCl, 0,25; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,25; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,50 (pH 7,0). Para detectar la respiración (en realidad la formación de NADH) de fuentes de carbono únicas, se incorporó a las microplacas el colorante cloruro de trifeníl tetrazolium redox (TTC) [29] y los treinta y un SC a concentraciones finales de 0,005 % y 0,1 % (w/v) respectivamente.

**Tabla 4.2** Sustratos carbonados utilizados, clasificados de acuerdo a su naturaleza química.

<u>Ácidos carboxílicos</u>	<u>Carbohidratos</u>	<u>Compuestos aromáticos</u>
Ácido acético	L-Arabinosa	Benzoato de sodio
Ácido cítrico	Celobiosa	Catecol
Ácido glutámico	D-Fructosa	
Ácido malónico	D-Galactosa	<u>Polímeros</u>
Ácido pirúvico	α-D-Glucosa	Dextrina
Ácido succínico	α-Lactosa	Inulina
	Maltosa	
<u>Alcohol</u>	D-Manitol	<u>Vitaminas hidrosolubles</u>
Glicerol	D-Manosa	Ácido ascórbico
	D-Rafinosa	Inositol
<u>Aminoácidos</u>	L-Ramnosa	Tiamina
L-Asparagina	Sacarosa	
Cisteína	Sorbosa	
L-Treonina	Xilosa	

Las microplacas se inocularon con 10  $\mu$ L de cultivos de los aislamientos con capacidad desnitrificante ( $DO_{620\text{ nm}} = 0,6$ ), y se mantuvieron en oscuridad a 28 °C durante 4 días. El desarrollo de color en los pozos por reducción del TTC, el cual es indicativo de la utilización del SC, se registró como densidad óptica (592 nm) utilizando un lector de microplacas (Synergy HT, Biotek Instruments, Vermont, EEUU).

### **Análisis estadístico**

En el análisis de utilización de SC, los datos obtenidos por cada pocillo se corrigieron restando el blanco correspondiente [149]. Solo los sustratos con una densidad óptica final corregida mayores a 0,2 fueron considerados como positivos [150]. Los patrones de utilización de sustratos (absorbancia registrada a 592 nm en cada pozo) se utilizaron para el análisis de agrupamiento usando el software estadístico InfoStat [91]. Las matrices de distancia fueron calculadas con distancia Euclídea y se utilizó el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA, por sus siglas en inglés). Los resultados se representaron en un dendrograma. Por otra parte se aplicó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para evaluar las diferencias en los niveles de actividad de cada sustrato. Se eliminaron del análisis los SC que no fueron utilizadas por ninguna cepa.

#### **4.2.4 Secuenciación e identificación de aislamientos**

A partir de la caracterización fisiológica de los aislamientos, se seleccionaron tres (3) cepas bacterianas (C1, C4 y C7) para su identificación taxonómica, las cuales formaban parte de los grupos más numerosos (I y IV). C1 se encontraba en el grupo IV que no incluía cepas de colección y de las que se encontraba a distancias Euclídeas mayores a 8, mientras que C4 y C7 se encontraban en el grupo I junto con 4 de las 5 cepas de colección incluidas en el estudio. C4 tuvo la menor distancia Euclídea (3,21) con la cepa *B. diazoefficiens* sp. nov. USDA110 y *B. japonicum* USDA 122, en tanto C7 tuvo capacidad similar de utilizar los SC que *P.aeruginosa* y quedó a una distancia de 3,86 por lo que se encontraba cercana.

La empresa MacroGen Inc. (Seúl, Corea) llevó a cabo la identificación taxonómica de las 3 cepas a través su servicio de secuenciación que incluyó: 1) extracción de ADN a partir de los cultivos puros, 2) amplificación del gen 16S rADN con los cebadores universales 27F y

1492R, y 3) secuenciación de los fragmentos amplificados utilizando los cebadores universales 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Las secuencias se compararon con la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que encuentra regiones de similitud local entre secuencias.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Aislamiento de bacterias desnitrificantes y caracterización molecular

Con el procedimiento dependiente de cultivo llevado a cabo, cincuenta y siete (57) aislamientos desarrollaron óptimamente con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrato y produjeron gas bajo condiciones anaeróbicas; y mediante la amplificación por PCR del gen 16S, se obtuvieron productos del tamaño esperado ( $\approx 1500$  bp).

De los 57 aislamientos provenientes de los diferentes tratamientos evaluados durante el año 2011 (**Tabla 4.3**), veinticinco (25) amplificaron correctamente el gen *nirK* pero no el gen *nosZ*, por esto fueron consideradas como “desnitrificadoras parciales”, ya que solo alcanzaron la reducción de nitrato a nitrito y de nitrito a óxido nítrico (gas). Las treinta y dos (32) cepas restantes, amplificaron tanto el gen *nirK* como el gen *nosZ*, involucrado en el último paso de la desnitrificación, por lo tanto fueron confirmadas como cepas desnitrificadoras.

En la **Tabla 4.4** se presentan los tamaños de las bandas obtenidos en el tamaño esperado para los genes *nirK* ( $\approx 514$  bp) y *nosZ* ( $\approx 267$  bp) de las 32 cepas desnitrificantes. Por cuestiones económicas, muchas veces se realizaban geles que incluían varias muestras, además de las cepas de este estudio, por lo que solo se presentan imágenes de dos geles donde solo se incluyeron cepas, para no confundir la interpretación de los datos. En las **Figuras 4.2** y **4.3** se muestra el patrón de bandas obtenido de algunos de los aislamientos para los genes *nirK* y *nosZ*, respectivamente.

**Tabla 4.3** Procedencia de las cepas obtenidas por métodos dependientes de cultivo y las confirmadas como desnitrificadoras por métodos moleculares.

Tratamiento <sup>a</sup>	Cepas aisladas <sup>b</sup>	Total de cepas aisladas y confirmadas <sup>c</sup>
SD - P - 0-5	<u>C6</u> - <u>C15</u> - <u>C28</u> - C30 - C34 - C44	6 (3)
SD - P - 5-20	<u>C3</u> - <u>C4</u> - C27 - C31 - <u>C38</u> - C39 - C45	7 (3)
SD - NoP - 0-5	<u>C13</u> - <u>C14</u> - C46 - C51 - C52 - <u>C56</u>	6 (3)
SD - NoP - 5-20	<u>C2</u> - <u>C5</u> - C47 - C48 - <u>C55</u>	5 (3)
LC - P - 0-5	<u>C1</u> - C9 - <u>C16</u> - <u>C17</u> - <u>C19</u> - <u>C21</u> - C22 <u>C23</u> - <u>C24</u> - <u>C29</u> - C32 - C33 - C49 - C57	14 (8)
LC - P - 5-20	<u>C25</u> - <u>C26</u> - <u>C40</u> - C53 - C54	5 (3)
LC - NoP - 0-5	<u>C10</u> - <u>C11</u> - <u>C12</u> - <u>C18</u> - <u>C20</u> - C35 - C36 C37 - <u>C41</u> - <u>C42</u> - C50	11 (7)
LC - NoP - 5-20	<u>C7</u> - <u>C8</u> - C43	3 (2)

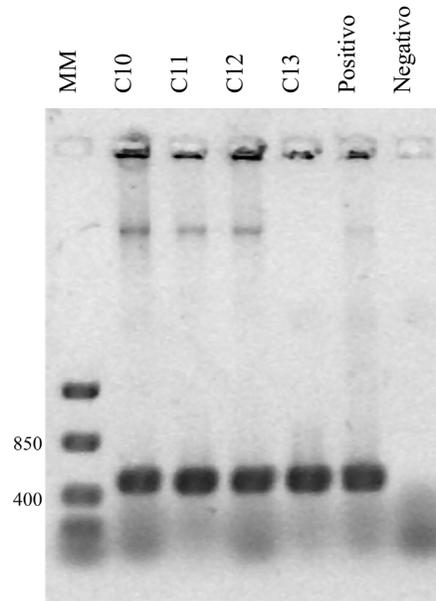
<sup>a</sup> SD, Siembra Directa; LC, Labranza Convencional; P, Pastoreado; NoP, No pastoreado; 0-5, Profundidad 0-5 cm; 5-20, Profundidad 5-20 cm.

<sup>b</sup> Cepas que amplificaron los genes *nirK* y *nosZ* subrayadas.

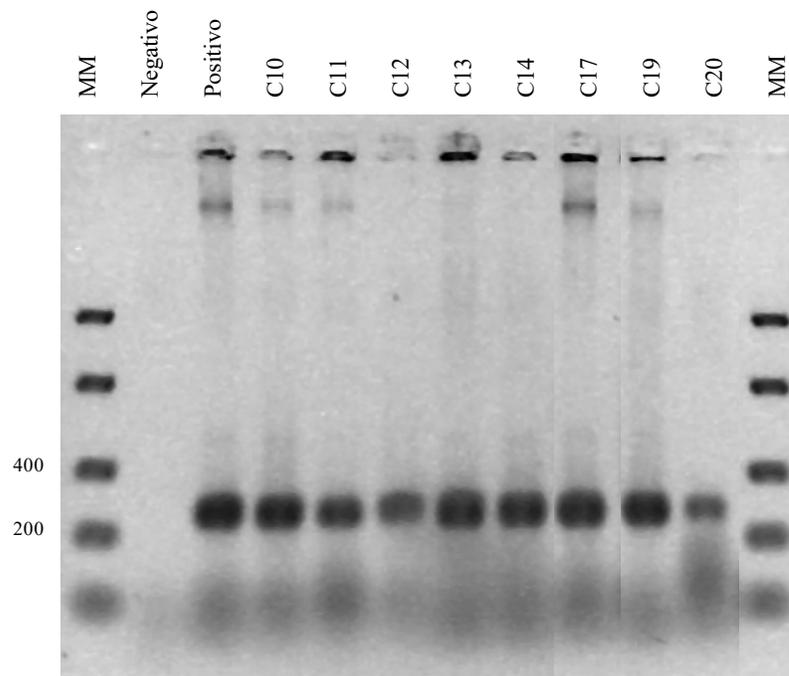
<sup>c</sup> Cepas confirmadas como desnitrificadoras (presencia de los genes *nirK* y *nosZ*) entre paréntesis.

**Tabla 4.4** Tamaño de los fragmentos amplificados (bp) de los genes *nirK* y *nosZ* para las 32 cepas desnitrificadoras

Cepa	<i>nirK</i>	<i>nosZ</i>
C1	514,5	265
C2	512	270
C3	512	285
C4	514,5	265
C5	514	270
C6	525,5	290
C7	518,5	279
C8	516	279
C10	516	279
C11	514	279
C12	514,5	265
C13	516	270
C14	512,9	267
C15	514,5	265,5
C16	512,9	260,8
C17	514,9	264,8
C18	506,9	265,5
C19	505,5	256,9
C20	505,5	261
C21	518,5	279
C23	518,5	282
C24	516	282
C25	516	282
C26	516,5	282
C28	518	289
C29	512,5	261,9
C38	513,9	265,5
C40	514	265,5
C41	505,5	251
C42	514	264
C55	516,5	272,6
C56	513,9	264,8



**Figura 4.2** Electroforesis en gel de los productos PCR del gen *nirK* de 4 aislamientos, 1 cepa de referencia y control negativo. El tamaño de las bandas corresponde al valor esperado (514 bp). MM = Marcador de peso molecular (50 - 1500 bp) de Fermentas.



**Figura 4.3** Electroforesis en gel de los productos PCR del gen *nosZ* de 8 aislamientos, 1 cepa de referencia y control negativo. El tamaño de las bandas corresponde al valor esperado (~267 bp). MM = Marcador de peso molecular (50 - 1,500 bp) de Fermentas.

El análisis por electroforesis sobre gel de agarosa de los productos PCR del intergen 16S-23S ITS para las 32 cepas desnitrificadoras, reveló diferente patrón de bandas. Del total de cepas desnitrificantes, en 18 se encontró una única banda, mientras que en 14 se obtuvo un patrón de 2 bandas y en 4 de ellas un patrón de 3 bandas (**Tabla 4.5**).

**Tabla 4.5** Patrón de bandas del 16S-23S ITS de los 32 aislamientos desnitrificantes. [Aislamiento (Tamaño banda) (bp)].

1 banda		2 bandas		3 bandas	
<b>C6</b>	(788,6)	<b>C2</b>	(670,6 / 523,5)	<b>C1</b>	(677,1 / 523,5 / 362,5)
<b>C10</b>	(694,4)	<b>C3</b>	(517,6 / 396,5)	<b>C4</b>	(662,5 / 523,5 / 416,7)
<b>C11</b>	(675,4)	<b>C7</b>	(722,2 / 310,3)	<b>C5</b>	(693,8 / 505,9 / 391,7)
<b>C12</b>	(713,5)	<b>C8</b>	(722,2 / 316,4)	<b>C21</b>	(693,4 / 445,6 / 410,7)
<b>C14</b>	(523,0)	<b>C13</b>	(655,8 / 523,0)		
<b>C15</b>	(692,0)	<b>C18</b>	(465,4 / 430,4)		
<b>C16</b>	(442,6)	<b>C26</b>	(713,0 / 511,4)		
<b>C17</b>	(463,9)	<b>C41</b>	(734,8 / 560,6)		
<b>C19</b>	(410,7)	<b>C42</b>	(742,1 / 567,8)		
<b>C20</b>	(433,5)	<b>C56</b>	(742,1 / 567,8)		
<b>C23</b>	(463,9)				
<b>C24</b>	(460,8)				
<b>C25</b>	(460,8)				
<b>C28</b>	(524,3)				
<b>C29</b>	(531,5)				
<b>C38</b>	(734,8)				
<b>C40</b>	(523,0)				
<b>C55</b>	(625,9)				

### 4.3.2 Caracterización fisiológica de los aislamientos

#### Curvas de crecimiento

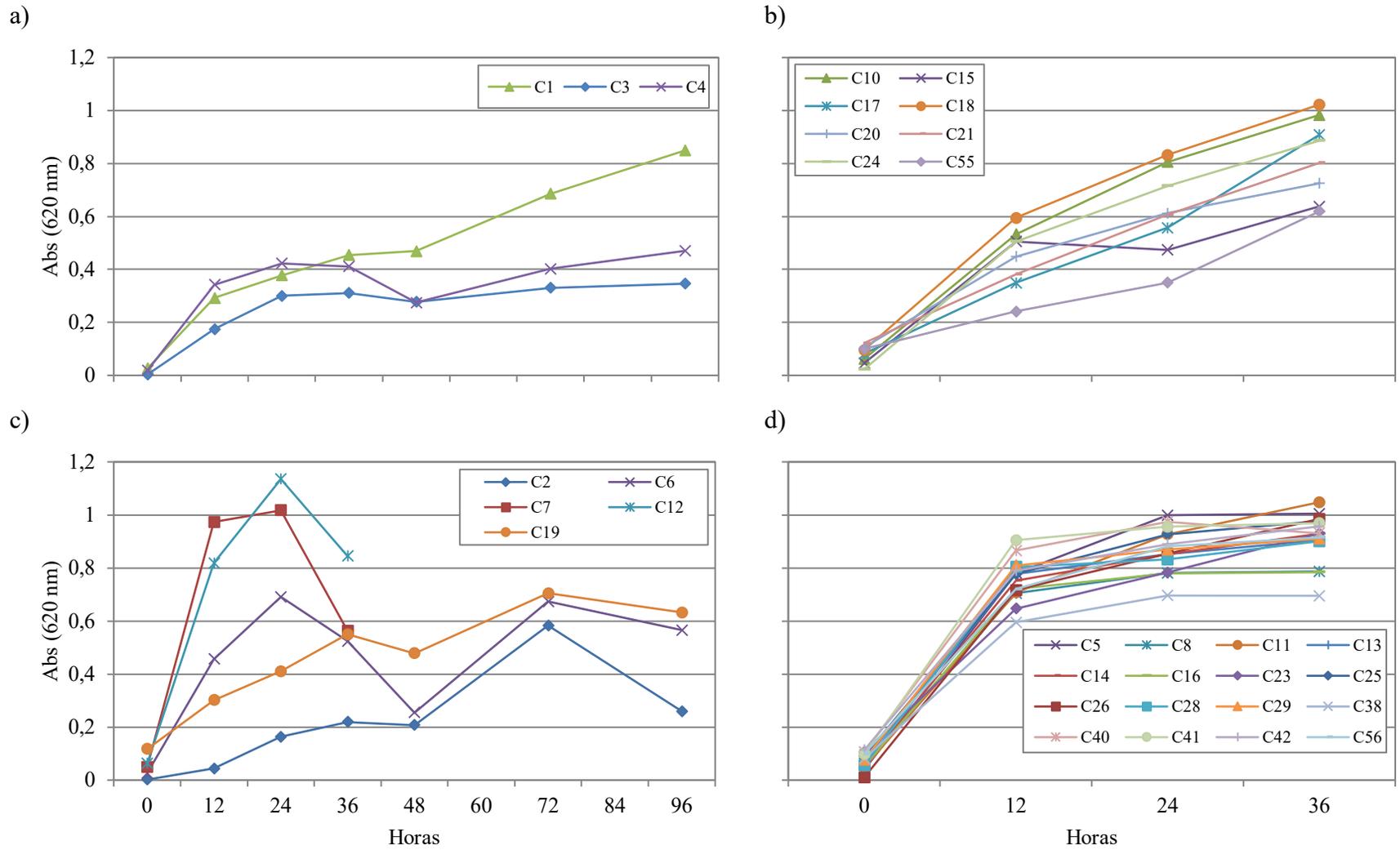
Los aislamientos obtenidos mostraron dos tipos de colonias, blanquecinas y amarillentas, y once cepas del total formaron biofilm. El desarrollo de las cepas en medio líquido, mostró diversos modelos de crecimiento (**Figura 4.4**). Tres (3) cepas mostraron un modelo de crecimiento lento, con DO inferiores a 0,6. Una de ellas (C1) llegó a 0,8 luego de 96 horas de incubación. Las ocho (8) cepas de crecimiento rápido llegaron a DO mayores a 0,6 después de 12 horas de incubación y luego se mantuvieron estables; mientras que otros dieciséis (16) aislamientos desarrollaron en forma lineal y constante, llegando a DO de 0,6 luego de 24 o 36 horas. Hubo cinco (5) cepas que tuvieron comportamientos especiales, ya que aumentaban y bajaban las DO en las distintas mediciones.

#### Utilización de sustratos carbonados

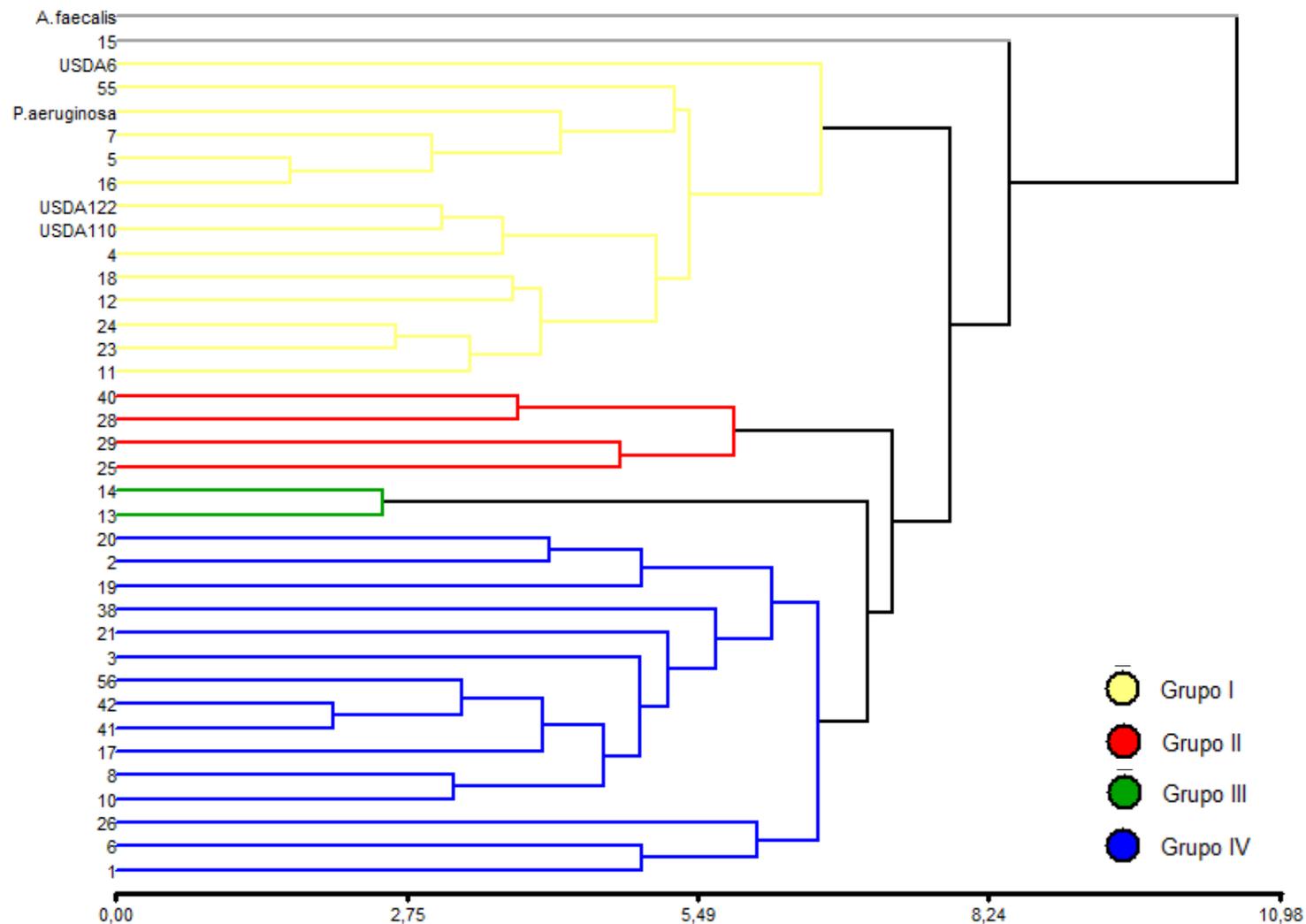
De los 31 SC evaluados, el catecol y la glucosa fueron los más utilizados. Mientras que la sorbosa, la inulina y la tiamina no fueron utilizadas por ninguna cepa; y hubo sustratos como el ácido malónico, la treonina, la cisteína y el benzoato de sodio que fueron utilizados por menos de 4 cepas.

Más del 50% de las cepas (19 cepas) exhibieron crecimiento sobre al menos la mitad de los SC estudiados, entre las cuáles se destacan varios carbohidratos (glucosa, galactosa, manosa, fructosa, celobiosa, maltosa, arabinosa, manitol y sucrosa), ácidos carboxílicos (ácido cítrico, ácido glutámico y ácido pirúvico) y otros compuestos (catecol, dextrina, glicerol y asparagina). Exceptuando la cepa C19, todas las cepas consumieron catecol; la segunda fuente más utilizada fue la glucosa, consumida por 31 de las 37 cepas; los ácidos cítrico y glutámico, fueron consumidos por 29 de las 37 cepas evaluadas; y la cepa C40 fue la que más SC utilizó (24 de 31).

La relación entre las 37 cepas evaluadas (32 cepas aisladas y 5 cepas de colección), basada en la utilización de 31 fuentes carbonadas revela que 35 de las 37 cepas se distribuyeron en 4 grupos distintivos a una distancia Euclídea de 6,7 (**Figura 4.5**). Las cepas *Alcaligenes faecalis* y C15 presentaron mayor distancia Euclídea (>6,7), por lo que no quedaron integradas en ningún grupo y se consideran cepas *outlier*.



**Figura 4.4** Curvas de crecimiento de las 32 cepas desnitrificadoras según los modelos de crecimiento lento (a), rápido (b), especial (c) y lineal (d).



**Figura 4.5** Dendrograma mostrando la relación fenotípica, basado en la utilización de 28 fuentes carbonadas y la distancia Euclídea, entre 32 aislamientos y 5 cepas de colección (*Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. USDA110 (USDA110), *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 (USDA122) y *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 (USDA6)). El análisis de agrupamiento se realizó usando el Ligamiento Promedio (UPGMA). El coeficiente de correlación cofenética ( $r$ ) fue 0,768.

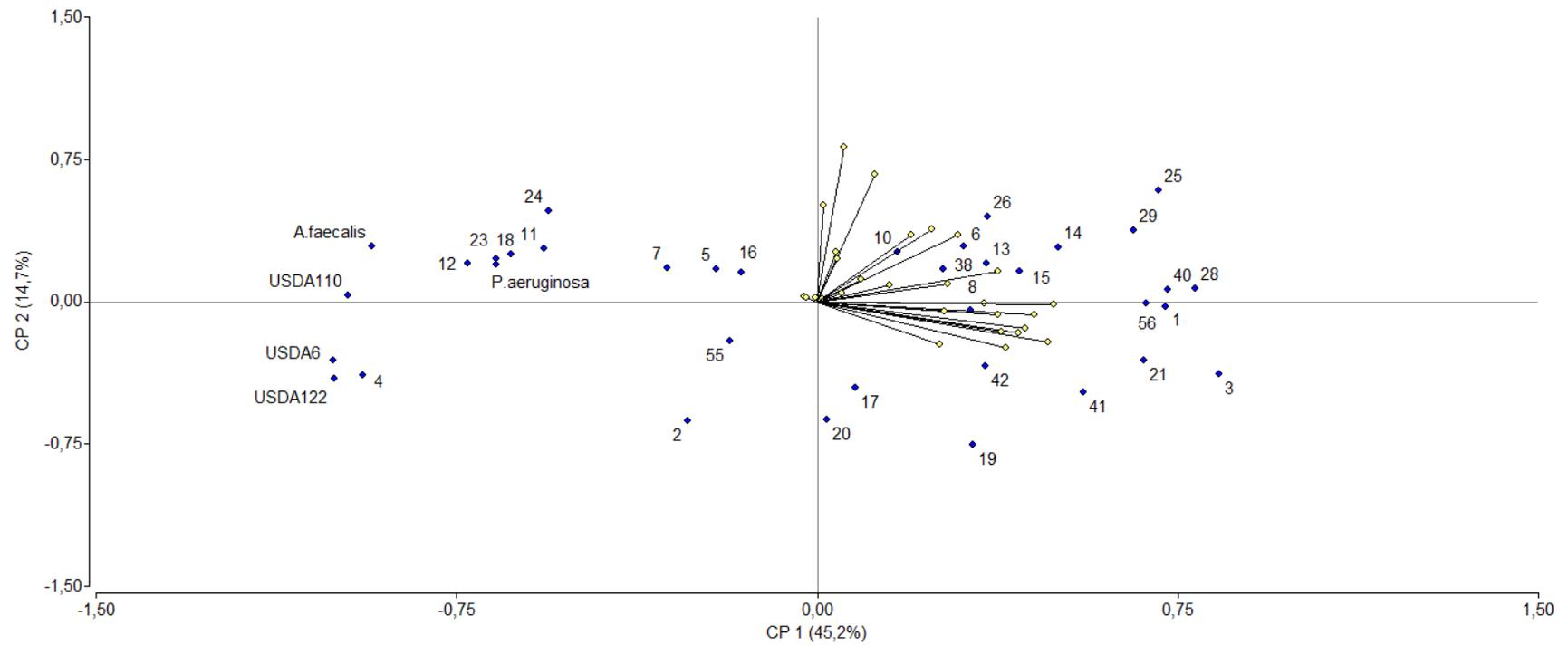
Todas las cepas evaluadas produjeron perfiles diferentes. La probabilidad de que cierta fuente de carbono sea utilizada por estas cepas difiere marcadamente por SC. El ácido malónico fue utilizado por una cepa de las 37 evaluadas; la cisteína, treonina y benzoato de sodio fueron utilizados por menos del 10% de las cepas; la lactosa y el ácido acético, se utilizaron en menos del 25% de los aislamientos; mientras que 5 SC fueron utilizados por más del 75% de los aislamientos, entre ellos la glucosa, ácido cítrico, ácido glutámico, asparagina y catecol.

Los cuatro grupos formados se diferencian en el número de cepas y por la cantidad o tipo de SC usado:

- Grupo I: Compuesto por 14 cepas que tuvieron por lo general baja actividad. Coincidieron en el patrón de consumo solo del catecol, mientras que 7 SC no fueron consumidos por ninguna cepa. Fue el grupo más variado de todos en el patrón de uso, desde cepas que usaron solo 1 fuente hasta cepas que usaron 14 fuentes, sin embargo en el dendrograma se observan en general distancias menores que en los otros grupos.
- Grupo II: Compuesto por 4 cepas que coinciden en el patrón de consumo de 26 SC: consumen 19 y no consumen 7. La cepa C29 difiere en 4 fuentes. Es un grupo menos diverso, que tiene un rango de uso de las fuentes de 20 a 24. Se observó crecimiento de las cepas sobre todos los carbohidratos (excepto sorbosa y lactosa), glicerol, y algunos ácidos carboxílicos (cítrico y glutámico), polímeros (dextrina), aminoácidos (asparagina), compuestos aromáticos (catecol) y vitaminas (ácido ascórbico e inositol).
- Grupo III: Lo forman 2 cepas que coinciden en el patrón de consumo de 30 SC: consumen 20 y no consumen 10. Difieren en el consumo de lactosa, que la usó la cepa C13. Es el grupo menos diverso (rango 20-21), pero influye que solo son dos cepas. Se observó crecimiento de las cepas sobre todos los carbohidratos (excepto sorbosa y lactosa), el glicerol, y los dos compuestos aromáticos. Además crecieron sobre algunos ácidos carboxílicos (cítrico, succínico y glutámico), aminoácidos (asparagina) y vitaminas (inositol).
- Grupo IV: es el grupo más abundante, con 15 cepas que coinciden en el patrón de consumo de 13 fuentes: consumen 6 y no consumen 7. Es el grupo más numeroso, y se observó que todas las cepas desarrollaron sobre unos pocos carbohidratos (celobiosa, fructosa, maltosa, y manosa), un polímero (dextrina) y el glicerol.

El análisis de componentes principales basado en las actividades de las cepas sobre las distintas fuentes carbonadas, tuvo una correlación cofenética elevada (0,931) considerando los dos primeros componentes, los cuáles explican el 59,9% de la variación (**Figura 4.6**). Los autovalores, autovectores y las correlaciones con las variables originales se muestran en la **Tabla 4.6**.

Coincidentemente con el análisis de agrupamiento, las cepas que tuvieron baja actividad (grupo I) se concentraron sobre coordenadas negativas del CP1, y estuvieron negativamente correlacionadas con la mayoría de las variables. Mientras que las cepas pertenecientes al grupo II, se correlacionaron positivamente con algunos carbohidratos (rafinosa, manitol y glucosa), aminoácidos (asparagina e inositol) y ácidos carboxílicos (ácido cítrico, glutámico y pirúvico).



**Figura 4.6** Representación de los 32 aislamientos y 5 cepas de colección (*Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. USDA110 (USDA110), *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 (USDA122) y *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 (USDA6)) en el plano de las dos primeras componentes principales (CP), calculadas usando la matriz de covarianzas construida en base a cada dato de sustrato metabolizado. Se muestra entre paréntesis el porcentaje de la varianza explicado por cada CP. Rombos amarillos (♦): tipo de sustrato. Rombos azules (♦): cepas.

**Tabla 4.6** Resultados del análisis de componentes principales, correlación cofenética = 0,931, considerando las 28 fuentes carbonadas que fueron utilizadas y las 37 cepas (32 aislamientos y 5 cepas de colección).

Autovalores				Autovectores			Correlaciones con las variables originales		
Lambda	Valor	Proporción	Acum	Variables	e1	e2	Variables	CP 1	CP 2
1	0,367	0,452	0,452	Arabinosa	0,293	-0,094	Arabinosa	0,890	-0,163
2	0,119	0,147	0,599	Celobiosa	0,325	-0,144	Celobiosa	0,880	-0,222
3	0,081	0,100	0,699	Fructosa	0,282	-0,111	Fructosa	0,887	-0,200
4	0,045	0,055	0,754	Galactosa	0,306	-0,046	Galactosa	0,917	-0,078
5	0,036	0,044	0,798	Glucosa	0,184	0,063	Glucosa	0,772	0,149
6	0,026	0,031	0,830	Lactosa	0,101	0,058	Lactosa	0,390	0,127
7	0,021	0,026	0,856	Maltosa	0,259	-0,109	Maltosa	0,865	-0,208
8	0,018	0,022	0,878	Manitol	0,254	0,108	Manitol	0,741	0,179
9	0,017	0,020	0,898	Manosa	0,254	0,046	Manosa	0,932	-0,095
10	0,013	0,016	0,914	Rafinosa	0,132	0,236	Rafinosa	0,444	0,455
11	0,011	0,014	0,928	Ramnosa	0,178	0,033	Ramnosa	0,699	-0,073
12	0,010	0,013	0,940	Sucrosa	0,235	0,007	Sucrosa	0,803	-0,013
13	0,009	0,011	0,951	Xilosa	0,265	-0,165	Xilosa	0,801	-0,285
14	0,008	0,010	0,961	Dextrina	0,172	-0,154	Dextrina	0,523	-0,266
15	0,007	0,008	0,969	Ác. Acético	-0,018	0,020	Ác. Acético	-0,132	0,083
16	0,005	0,007	0,976	Ác. Cítrico	0,038	0,552	Ác. Cítrico	0,103	0,859
17	0,004	0,006	0,981	Ác. Malónico	-0,016	0,015	Ác. Malónico	-0,258	0,143
18	0,003	0,004	0,985	Ác. Pirúvico	0,009	0,344	Ác. Pirúvico	0,023	0,531
19	0,003	0,004	0,989	Ác. Succínico	0,027	0,176	Ác. Succínico	0,129	0,481
20	0,002	0,002	0,991	Ác. Glutámico	0,081	0,453	Ác. Glutámico	0,249	0,793
21	0,002	0,002	0,993	Glicerol	0,332	0,008	Glicerol	0,889	-0,013
22	0,002	0,002	0,995	Asparagina	0,198	0,239	Asparagina	0,656	0,450
23	0,001	0,002	0,997	Cisteina	0,034	0,029	Cisteina	0,310	0,148
24	0,001	0,001	0,998	Treonina	0,007	0,008	Treonina	0,117	0,077
25	0,001	0,001	0,999	Catecol	0,028	0,152	Catecol	0,130	0,398
26	4,00E-04	4,90E-04	1,000	Benzoato de Sodio	-0,002	0,013	Benzoato de Sodio	-0,013	0,059
27	2,40E-04	3,00E-04	1,000	Ác. Ascórbico	0,062	0,080	Ác. Ascórbico	0,414	0,302
28	1,10E-04	1,40E-04	1,000	Inositol	0,161	0,260	Inositol	0,470	0,434

### 4.3.3 Identificación de cepas bacterianas

Se identificaron taxonómicamente las cepas C1, C4 y C7. Las secuencias del ADNr 16S obtenidas mostraron que la cepa C1 tuvo un 99% de similitud con *Cellulosimicrobium* sp. NEAU-Z02 (N° de acceso HM623867.1); la cepa C4 tuvo 97% de semejanza con *Bacillus pumilus* strain UFV-E34 (N° de acceso EU407552.1); y para la cepa C7 se encontró 99% de similitud con *Stenotrophomonas* sp. CK6 (N° de acceso AJ870967.1).

## 4.4 Discusión

Los análisis moleculares de las comunidades ambientales han revelado que la fracción cultivable representa <1% del número total de especies procariotas presentes en cualquier muestra dada [151]. En general se considera que el aislamiento y la caracterización de bacterias desnitrificantes basado en sus capacidades de reducción de N<sub>2</sub>O [152] se ven obstaculizados por el sesgo que tienen las técnicas dependientes de cultivo y el gran esfuerzo manual, debido al hecho de que las bacterias desnitrificantes representan un bajo porcentaje de las bacterias totales [90]. En esta tesis, el procedimiento desarrollado para el aislamiento de microorganismos desnitrificantes de suelos semiáridos resultó exitoso, permitiendo obtener colonias aisladas y puras. Es un método relativamente rápido, que tiene la ventaja de continuar el aislamiento desde las microplacas en las que se determinó el NMP. No son necesarios en todos los pasos los productos de anaerobiosis, que resultan costosos y muchas veces difíciles de obtener; y la capacidad para desnitrificar se confirma mediante el uso de herramientas moleculares.

El 57,9 % de los aislamientos obtenidos en esta primera instancia provenían de suelos bajo LC, y el 56,1 % de suelos pastoreados. De las cepas confirmadas como desnitrificadoras (por presencia de los genes *nirK* y *nosZ*) más del 60% procedían de muestras de suelos que estaban bajo LC, y más de la mitad (53,13 %) procedían de muestras pastoreadas. Sin embargo, la procedencia de los aislamientos no es traducible a ningún término de diversidad o abundancia; ya que las técnicas dependientes de cultivo, a pesar de ser importantes en la investigación de la ecología microbiana de ambientes

naturales y antropogénicos impactados, pueden conducir a una visión no representativa de las poblaciones microbianas [151, 153].

El 44 % de las cepas presentaron solo el gen *nirK* (con un fragmento que varió entre 505,5-525,5 bp), por lo que se denominaron “desnitrificadoras parciales”. Esta clasificación incluye bacterias que contienen al menos una pero no todas las óxido nítrico reductasas productoras de gases requeridas para la desnitrificación [52]. En algunos casos, la presencia de solo una reductasa puede ser claro, por ejemplo, la óxido nítrico reductasa puede jugar un papel en la mitigación de la toxicidad por NO [52, 154]. En otros casos, la exclusividad de una reductasa puede sugerir que no esté estrictamente acoplada a la desnitrificación, por ejemplo, en aislamientos con genes que solo codifican una proteína con NirK [155]. El papel de esta proteína no se ha definido, pero el trabajo previo en un aislamiento de *Rhizobium* sugiere que podría estar involucrado en la desintoxicación de metales [156], [157]. Roco y col. [155] afirman que la ocurrencia común de desnitrificadores parciales que encontraron entre los organismos secuenciados en las bases de datos públicas, es consistente con la idea de que solo se mantendrán aquellos genes que brindan un beneficio, y que los genes no esenciales se perderán con el tiempo, probablemente como consecuencia de cambios en las condiciones ambientales.

El conocimiento de la ecología de las bacterias reductoras de N<sub>2</sub>O es de crucial importancia para comprender mejor los factores que gobiernan los flujos de N<sub>2</sub>O del medio ambiente, en especial de los suelos. En este estudio, se logró en el 56 % de los aislamientos la amplificación por PCR del gen *nosZ*. Se aplicó un protocolo de PCR con gradiente de temperatura, técnica con la cual se aumentó la especificidad, sensibilidad y rendimiento [158]. La optimización de este protocolo (**Capítulo 3**), sugiere la baja especificidad de la temperatura de hibridación propuesta por estos autores, aunque debe considerarse que los resultados obtenidos en estudios de diversidad basados en PCR, están fuertemente influenciados por la elección inicial del conjunto de cebadores. Debido a la completa falta de conocimientos bioquímicos y genéticos de la etapa de reducción de óxido nítrico en bacterias Gram positivas, los cebadores *nosZ* existentes se limitan al gen *nosZ* de Proteobacteriaceae [39]. En este estudio, a pesar de que se logró amplificar el gen en los aislamientos y las cepas de referencia, no se encontró coincidencia generalizada en el tamaño del fragmento, el cual varió entre 251-289 bp. Esto parece indicar que hay variación

en la secuencia amplificada del gen *nosZ* en los aislamientos obtenidos, y concuerda con la bibliografía referida al tema, que indica que existe una alta biodiversidad de este gen [90, 159]. En particular para suelos agrícolas, se han encontrado cambios en la diversidad de la comunidad desnitrificadora en suelos bajo labranza convencional, respecto a suelos nunca labrados [160].

El estudio del ITS arrojó variados patrones de bandas para los distintos aislamientos indicando diferencias en el número de copias del operón ribosómico. Algunas cepas coincidieron en el número y tamaño de las bandas, lo que podría indicar que se trata de una misma cepa. Esta heterogeneidad, que se puede encontrar tanto en términos de la cantidad como en la longitud de los espaciadores, permite la tipificación e identificación de bacterias [148], sin embargo la variación intragenómica del ITS puede llevar a una sobreestimación del número de bacterias funcionalmente diferentes, ya que la diversidad genética a nivel de cepa ha sido definitivamente ligada a la diversidad de ecotipos bacterianos. En particular, la heterogeneidad intragenómica en la longitud del ITS tiene el potencial de sesgar las estimaciones de la diversidad que se basan únicamente en las técnicas de fingerprinting o huella de ADN. Por lo tanto, evaluar con precisión la microdiversidad bacteriana utilizando técnicas basadas en ITS, requiere una comprensión de cómo esta región se desarrolla en distintos taxones bacterianos [161].

La evaluación de utilización de SC mostró patrones variados entre las cepas evaluadas. El análisis del dendrograma y los resultados obtenidos con ACP, muestra que existen marcadas diferencias entre las cepas aisladas de un mismo tipo de suelo. La pertenencia a un mismo grupo por la similitud en el consumo de SC, no indica necesariamente que estén relacionados filogenéticamente. En este tipo de estudio, hay que destacar que no se trata de evaluar la utilización de sustratos individuales, sino el cambio en el patrón de utilización de sustrato [46]. Además CLPP no es un método independiente de cultivo, sino más bien está sesgado hacia las especies de crecimiento rápido, fácilmente cultivables [29]. Por lo tanto, ya sea para estudios a nivel de cepa como a nivel de comunidad, CLPP no debe ser visto como un método independiente, sino como un método altamente complementario a otros enfoques.

Finalmente, en este estudio se conoció la identidad de los tres aislamientos seleccionados. Las secuencias del gen 16 rRNA de las cepas desnitrificantes mostraron una

amplia diversidad bacteriana, ubicándose en tres grandes grupos taxonómicos: *Proteobacteria*; *Firmicutes*, bacterias Gram positivas con bajo contenido de C+G y; *Actinobacteria*, Gram positivas con alto contenido de C+G. De los tres géneros encontrados, el hábitat primario de *Bacillus* es el suelo; las especies de *Stenotrophomonas* pueden ser ubicuas en el medio ambiente, aunque el suelo y las plantas son su principal reservorio ambiental [162]; y también se han encontrado especies de *Cellulosimicrobium* características de suelo [163]. Además, estos géneros han sido estudiados por su capacidad reductora de nitrato y desnitrificante [164].

## 4.5 Conclusiones

A través del método de aislamiento de bacterias utilizado, se pudieron aislar cepas potencialmente desnitrificantes a partir de suelos semiáridos agrícolas argentinos.

El análisis a nivel molecular de los aislamientos, permitió el hallazgo de cepas desnitrificadoras parciales y completas, lo que lleva a plantear que el proceso de desnitrificación no está obligatoriamente vinculado a desnitrificadores completos, sino a la consecuencia de una comunidad funcionalmente diversa.

Asimismo, los estudios del 16S-23S ITS para las 32 cepas desnitrificadoras completas, evidenciaron diferencias entre los aislamientos, confirmando la variación en el número de copias del operón ribosómico entre cepas de un mismo suelo.

Las cepas desnitrificadoras completas, mostraron distintas formas de crecimiento, y el análisis de la utilización de SC, mostró variación en el patrón de fuentes consumidas, siendo el catecol y la glucosa los sustratos más utilizados.

Finalmente, la secuenciación del ADNr 16S clasificó a las tres cepas seleccionadas en grupos taxonómicos diferentes, mostrando que en los suelos estudiados habría diversidad de bacterias desnitrificantes.

# CAPÍTULO 5

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LA DEGRADACIÓN DE RASTROJO

### 5.1. Introducción

En los sistemas agrícolas, la descomposición de residuos de cultivos o rastrojos es un proceso importante, ya que permite el ciclado de los elementos en el ecosistema [165]. Los residuos vegetales añadidos al suelo son transformados en CO<sub>2</sub>, material microbiano y componentes húmicos relativamente estables. La rapidez con la cual estas transformaciones ocurren depende no solo de las condiciones ambientales, sino también de la química de los residuos [166].

Los organismos del suelo son los responsables de las transformaciones de los nutrientes en el mismo, desempeñando un rol muy importante en la fertilidad. Los procesos microbiológicos e incrementos de la actividad biológica se miden usando diversas variables, como biomasa microbiana, respiración y actividades enzimáticas [167, 168].

Al ser un proceso mediado por microorganismos, la descomposición de los residuos vegetales se acompaña de cambios en la composición de las enzimas del suelo responsables de la mayor parte de estas transformaciones [166]. Las enzimas del suelo son, sin duda, uno de los principales componentes que participan y aseguran la secuencia correcta de todas las rutas bioquímicas en los procesos de los ciclos biogeoquímicos que ocurren en el suelo. Por lo tanto, resulta pertinente estudiar la actividad de ciertas enzimas durante la descomposición de residuos vegetales.

Las enzimas deshidrogenasas son oxidoreductasas, producidas por todos los organismos y ligadas a procesos respiratorios [169], que catalizan la oxidación biológica de compuestos orgánicos, desempeñando un rol significativo en la oxidación de la materia orgánica del

suelo [170]. Es un método confiable para la medición de la capacidad de mineralización de los microorganismos del suelo, y es apropiado para evaluar la actividad promedio de la población activa de microorganismos en intervalos de tiempo cortos [171]. La ureasa es una amidohidrolasa que cataliza la hidrólisis de urea a  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ , y en los suelos es esencialmente una enzima extracelular, que se acumula en los mismos como resultado de la liberación desde células microbianas vivas y desintegradas. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada como consecuencia del alto grado de utilización de urea a modo de fertilizante nitrogenado [170].

La respiración inducida por sustrato (SIR) es un método basado en la detección de la respuesta respiratoria de los microorganismos del suelo a la glucosa. Es un parámetro sensible que tiene dos requerimientos principales. En primer lugar, las muestras deben ser saturadas con el sustrato con respecto a la respuesta; y en segundo lugar, la respuesta a la adición del sustrato debe ser medida antes de cualquier aumento en la biomasa de los microorganismos [32]. Basado en este principio, el método permite estimar el C de la biomasa microbiana y se considera que para la conversión de 1 mL de  $\text{CO}_2 \text{ h}^{-1}$  es necesaria la presencia de al menos 40 mg de C de la biomasa microbiana [32, 172]. La medida de la biomasa microbiana es un procedimiento básico para los estudios ecológicos del suelo [173].

Además de la comunidad microbiana, los factores del suelo como humedad, temperatura, pH, aireación y disponibilidad de nutrientes, también controlan el proceso de degradación de rastrojo [174], siendo los más determinantes la temperatura y la humedad [175]. Los factores que producen el mayor efecto sobre el crecimiento y actividad microbiana tendrán el mayor potencial para regular la tasa de descomposición [176].

En base a los resultados a campo de los dos primeros años de muestreo (**Capítulo 3**), se decidió llevar a cabo un estudio *in vitro* para evaluar el impacto del nivel de agua en suelo sobre las actividades microbianas y si es posible ver un efecto debido a la dosis de nitrógeno. Considerando esto, se planteó evaluar los cambios de la SIR y la actividad enzimática en suelos sometidos a diferentes dosis de agua y fertilización, durante la degradación de rastrojo, bajo condiciones controladas de laboratorio.

## 5.2. Materiales y Métodos

### 5.2.1 Preparación de microcosmos

El estudio se llevó a cabo en un ensayo en microcosmos bajo condiciones controladas de laboratorio por un período de cuatro meses. La experiencia se inició a los siete (7) días del segundo muestreo del año 2010 (BOR4), utilizando el suelo remanente de éste muestreo luego del fraccionamiento para las determinaciones correspondientes a los **Capítulos 3** y 4. Para esto, se hizo un pool con todas las muestras tomadas en las parcelas bajo SD sin fertilizar y no pastoreadas. Además, durante BOR4 se recolectó rastrojo de trigo de esas mismas parcelas, el cual fue almacenado por una semana a temperatura ambiente hasta su utilización, sin realizar un tratamiento adicional.

Los microcosmos se prepararon de acuerdo al modelo de Gallardo y Merino [177] con modificaciones (**Figura 5.1**). Los mismos consistieron en recipientes plásticos de 10 cm de diámetro y 10 cm de altura, provistos de tapa. En la parte inferior se colocaron alrededor de 25 g de perlita para contener el posible exceso de agua del sistema, y por encima aproximadamente 450 g de suelo. Sobre el suelo se colocaron 3 g de rastrojo de trigo, sin tratamiento previo, envueltos en bolsas de malla de 1 mm. La cantidad de suelo a incorporar se calculó por comparación del volumen de una hectárea en 5 cm, con una



**Figura 5.1** Ensayo de microcosmos de suelo.

densidad aparente promedio de  $1,2 \text{ Mg m}^{-3}$ . El cálculo de rastrojo a incorporar se hizo a partir de datos de rendimiento del ensayo de campo [65]. El valor medio de rendimiento de trigo en distintos años de cosecha (1999-2007) fue aproximadamente  $2500 \text{ kg ha}^{-1}$ . La cantidad de paja agregada fue de  $6,6 \text{ g}$  por  $\text{kg}$  de suelo ( $0,66\%$ ), ya que se tuvo en cuenta y se intentó simular el bajo volumen de rastrojo que se encontraba en el campo durante el muestreo, como consecuencia de la pérdida del trigo debido a la sequía.

Para calcular las dosis de agua a utilizar en el ensayo *in vitro* se realizó un análisis de los valores históricos de precipitaciones del sitio de muestreo. Se observaron las precipitaciones mensuales desde el año 1928 hasta el 2010, y el total de cada año (INTA, 2012), y se consideró el promedio de la precipitación de los primeros seis meses de: tres años “secos” (promedio =  $161,1 \text{ mm}$ ); tres años “normales” o “promedios” (promedio =  $307,3 \text{ mm}$ ); y tres años óptimos (promedio =  $559,8 \text{ mm}$ ) (Tabla 5.1). Se tuvieron en cuenta los primeros 6 meses, período del en que el rastrojo queda en el suelo luego de una cosecha. En base a estos valores, el volumen del recipiente y la cantidad de suelo, se determinaron las 3 dosis diferentes de agua.

**Tabla 5.1** Lluvias registradas (mm) en el primer semestre en años seleccionados para el ensayo *in vitro*.

Condición	Año	E	F	M	A	M	J	Anual
<b>Sequía</b>	1949	22,4	24,8	75,0	0,5	13,9	8,9	471,7
	2005	112,0	35,5	43,5	9,5	9,0	11,5	486,3
	2009	9,0	23,0	65,5	0,0	19,2	0,2	472,9
<b>Normal</b>	2002	13,5	89,0	42,5	50,3	56,5	4,0	688,3
	2004	53,2	21,4	56,7	20,1	81,3	26,3	641,2
	2007	43,0	155,5	114,5	84,3	9,7	0,0	778,2
<b>Óptimo</b>	1998	214,4	254,4	20,4	101,0	31,0	9,8	888,2
	1999	153,8	92,2	142,0	77,0	21,6	11,9	910,3
	2001	126,0	117,0	143,0	118,0	34,5	11,5	1081,8

Se consideraron dos factores principales para la definición de los tratamientos (**Tabla 5.2**):

A. *Dosis de agua*: a) 1 mm día<sup>-1</sup> (condición para simular sequía); b) 1,5 mm día<sup>-1</sup> (condición normal en ese suelo) y; c) 3 mm día<sup>-1</sup> (condición óptima para ese suelo).

B. *Fertilización nitrogenada*: se consideraron dos niveles de fertilización nitrogenada (kg N ha<sup>-1</sup>). Los microcosmos sin fertilizar (0N) se pensaron como testigos de los fertilizados (60N). Las dosis de los microcosmos con 60N se aplicó en forma fraccionada (30 + 30) a la tercer y séptima semana de comenzado el ensayo.

Los microcosmos se mantuvieron durante todo el experimento a 22 °C. Se realizaron muestreos destructivos de tres (3) réplicas por tratamiento a las 2, 4, 8 y 16 semanas, para analizar diferentes variables. Tres microcosmos adicionales fueron preparados para determinar cuáles eran las condiciones originales (0 semanas).

Se efectuaron determinaciones de humedad de los suelos simultáneamente con los análisis mencionados, para expresar los resultados basados en el peso seco del suelo. El contenido de humedad se determinó por la diferencia de peso que experimentaron las muestras después de ser sometidas a calentamiento a 105 °C por 24 h.

**Tabla 5.2** Diseño experimental (N=12).

		Dosis de agua (mm H <sub>2</sub> O día <sup>-1</sup> )		
		1	1,5	3
Dosis de nitrógeno (kg N ha <sup>-1</sup> )	0	T <sub>W1-N0</sub>	T <sub>W1,5-N0</sub>	T <sub>W3-N0</sub>
	60	T <sub>W1-N60</sub>	T <sub>W1,5-N60</sub>	T <sub>W3-N60</sub>

### 5.2.2 Degradación del rastrojo

En cada etapa de muestreo se evaluó la pérdida de biomasa de rastrojo (g). El material contenido en la bolsa de cada microcosmos fue secado en estufa de tiro forzado a 55°C durante 48 horas o hasta que el peso de la masa remanente se mantuvo constante [178].

### 5.2.3 Respiración inducida por sustrato

Se determinó la tasa de desprendimiento de CO<sub>2</sub> del suelo con agregado de glucosa para estimar la SIR [172]. En primer lugar, se calculó la dosis óptima de glucosa [179] midiendo la producción de CO<sub>2</sub> de muestras de suelo con agregado de 1, 2, 4 y 8 g de glucosa por kilogramo de suelo. Una vez elegida la dosis óptima de glucosa se calculó la curva de crecimiento microbiano para determinar el tiempo óptimo de incubación, midiendo el CO<sub>2</sub> producido luego de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas de incubación.

De cada muestra se pesaron 20 g de suelo en recipiente plástico y se agregó una solución de glucosa (Cicarelli, Argentina) al 5%, esterilizada previamente por filtración, llegando a una concentración final de 2 g kg<sup>-1</sup> suelo. Cada recipiente se ubicó en un frasco de 750 mL junto con un vial plástico que contenía 20 mL de NaOH (Anedra, Argentina) 0,015 N, y se cerró herméticamente. Simultáneamente se preparó un blanco sin suelo. Los frascos se incubaron a 22°C durante 6 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la cantidad de CO<sub>2</sub> desprendido por el método de absorción en álcali seguida de titulación [76]. Brevemente, a 10 mL de la solución de NaOH se le agregó 2,5 mL de una solución de BaCl<sub>2</sub> (Cicarelli, Argentina) 3N. Inmediatamente antes de la titulación con HCl (Cicarelli, Argentina) 0,01 N, se agregaron 3-4 gotas de una solución alcohólica de fenolftaleína (Mallinckrodt, USA), que sirvió como indicador de equimolaridad. Los resultados del contenido de C de la biomasa microbiana por gramo de suelo seco se calcularon aplicando la ecuación 5.1.

$$\text{SIR (mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}) = \frac{(\text{B}-\text{S}) \times \text{N} \times \text{E} \times 50}{\text{t} \times 1000} \quad (5.1)$$

Donde:

B = volumen de HCl consumido con el blanco (mL)

S = volumen de HCl consumido con el suelo (mL)

N = normalidad del HCl

E = factor de conversión = 22 (1 meq CO<sub>2</sub> = 22 mg CO<sub>2</sub>)

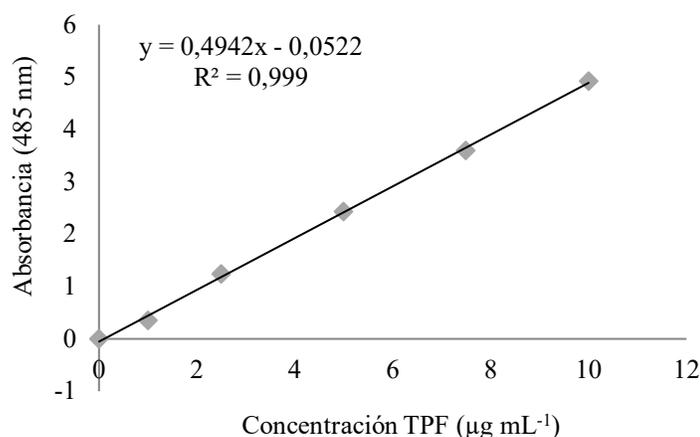
T = tiempo de incubación (h)

1000 = para expresar resultados en gramos

## 5.2.4 Determinación de la actividad enzimática

### Actividad deshidrogenasa

El estudio de la actividad enzimática de la deshidrogenasa (DHA) en el suelo se realizó en base a la determinación colorimétrica de 2,3,5-trifenilformazán (TPF), originado de la reducción del sustrato cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) (Mallinckrodt, USA), de acuerdo a [171]. Brevemente, se pesaron 3 gramos de suelo fresco en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL, al cual se le agregaron 1 mL de solución acuosa de TTC al 3% y 4 mL de solución tampón de fosfato (pH = 7,6). Simultáneamente, para cada repetición de suelo, se preparó un blanco con agua destilada en reemplazo de la solución de TTC. Luego cada tubo fue tapado, agitado brevemente con la mano, e incubado a 37°C por 24 horas en la oscuridad. Luego de la incubación, se agregó a cada tubo 10 mL de acetona (Dorwil, Argentina) para extraer el TPF formado. Los tubos fueron agitados primero manualmente y luego en un agitador orbital a 300 rpm por 30 minutos, luego fueron centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se filtró usando papel de filtro (S&S N° 859). La concentración de TPF se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (Metrolab 330 UV-vis, Argentina) a una longitud de onda de 485 nm, con acetona como blanco. Las concentraciones del producto enzimático se determinaron utilizando una curva estándar de TPF (Fluka, Japan) en acetona (**Figura 5.2**). Finalmente la actividad deshidrogenasa se estimó utilizando la ecuación 5.2.



**Figura 5.2** Curva estándar de calibración de la absorbancia a 485 nm en función de la concentración de 2,3,5-trifenilformazán en acetona.

$$\text{Actividad deshidrogenasa } (\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ día}^{-1}) = \frac{(AS-AB) \times F_{C/A}}{sse \times t} \quad (5.2)$$

Donde:

AS = absorbancia del suelo

AB = absorbancia del blanco

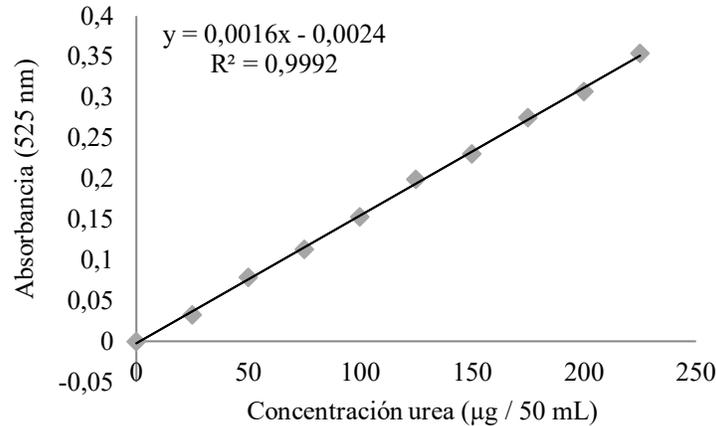
$F_{C/A}$  = factor que relaciona concentración (C) y absorbancia (A) ( $F_{C/A} = 1 /$  pendiente de la recta) ( $\mu\text{g TPF}$ )

sse = peso del suelo seco a estufa ( $105^{\circ}\text{C}$ ) (g) [ $sse = 3 / (1 + \text{coef. de humedad del suelo seco al aire})$ ]

t = tiempo de incubación (h) (t = 6)

### Actividad ureásica

La actividad enzimática de la ureasa (UA) en el suelo se estimó por el método de la urea remanente [170]. Se pesaron 5 g de suelo fresco en un frasco de 125 mL, al cual se agregaron 5 mL de solución de urea (J. T. Baker, USA) al 0,2 %. Los frascos se taparon e incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 horas en la oscuridad. Luego de la incubación, a cada frasco se le agregaron 50 mL de una solución de KCl (Cicarelli, Argentina)-acetato fenilmercúrico (PMA) (Fluka Chemie AG, Switzerland) 2 M para detener la actividad enzimática, y se continuó con una agitación rotativa a temperatura ambiente durante 1 hora. Al cabo de ese tiempo, los contenidos de los frascos se filtraron usando papel de filtro Wathman N° 42. Del filtrado se tomó una alícuota de 1 mL y se ubicó en un matraz de 50 mL, ajustando el volumen a 10 mL con KCl-PMA 2M y agregando luego 30 mL de reactivo de color [butanedione monoxime (Sigma Chemical Co., USA) + tiosemicarbazida (Merck, Germany)], simultáneamente se preparó un blanco, sin alícuota de filtrado. La mezcla se agitó durante unos pocos segundos y cada matraz, semitapado, se ubicó en un baño térmico ( $95\text{-}98^{\circ}\text{C}$ ) para el desarrollo de color. Después de 30 minutos, los matraces se sumergieron inmediatamente en un baño térmico con agua fría ( $15^{\circ}\text{C}$ ) durante 15 minutos y se procedió al enrase de los mismos con agua destilada. La concentración de urea se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (Metrolab 330 UV-vis, Argentina) a una longitud de onda de 525 nm. Las concentraciones del producto enzimático se determinaron utilizando una curva estándar de calibración de urea en KCl-PMA 2M (**Figura 5.3**). La actividad ureásica se estimó aplicando la ecuación **5.3**.



**Figura 5.3** Curva estándar de calibración de la absorbancia a 525 nm en función de la concentración de urea en solución de KCl-acetato fenilmercúrico.

$$\text{Actividad ureásica } (\mu\text{g urea hidrolizada g}^{-1}\text{suelo}^{-1}) = \frac{10000 - (A \times F_{C/A} \times F_d)}{\text{sse} \times t} \quad (5.3)$$

Donde:

10000 = cantidad de urea agregada al suelo ( $\mu\text{g}$ )

A = absorbancia

$F_{C/A}$  = factor que relaciona concentración (C) y absorbancia (A) ( $F_{C/A} = 1 /$  pendiente de la recta) ( $\mu\text{g urea}$ )

$F_d$  = factor de dilución; [ $F_d = 1 /$  dilución = agua libre (mL) + agua capilar (mL) + 55 (mL)]

sse = peso del suelo seco a estufa ( $105^\circ\text{C}$ ) (g) [sse = 5 g / (1 + coef. de humedad del suelo seco al aire)]

t = tiempo de incubación (h) (t = 5)

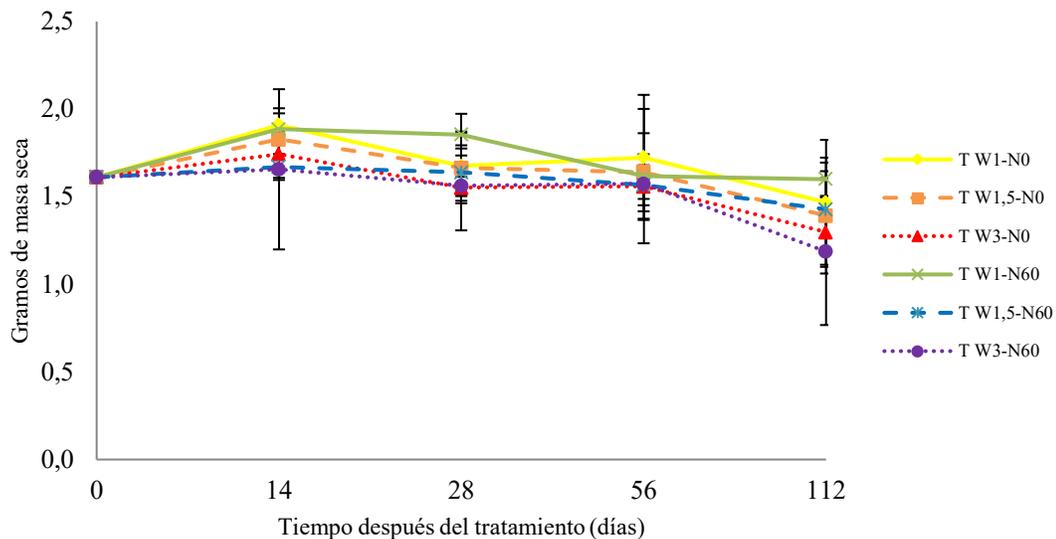
### 5.2.5 Análisis estadístico

Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) triple para determinar la significación de los efectos de tres factores fijos (dosis de agua, fertilización nitrogenada y tiempo transcurrido) y sus interacciones. En las variables dependientes en las cuales se detectaron interacciones significativas entre los factores ( $p < 0,05$ ), se continuó el estudio con los factores por separado. Las medias se compararon por la prueba de Bonferroni, con un nivel de significancia de 0,05, empleando el software estadístico InfoStat [91].

## 5.3. Resultados

### 5.3.1 Degradación del rastrojo

En los microcosmos se observó pérdida de peso seco de rastrojo, aunque en forma muy lenta (**Figura 5.4**). El  $T_{W3-N60}$  tuvo mayor degradación que el resto de los tratamientos, pesando el rastrojo 1,187 g a los 112 días de iniciado el ensayo, representando una pérdida de peso seco de 0,424 g. En el análisis estadístico no se hallaron evidencias de interacción entre los tres factores evaluados ( $p > 0,85$ ). Hubo efectos altamente significativos debido a la dosis de agua ( $p = 0,0061$ ) y el momento de muestreo ( $p = 0,0005$ ), especialmente finalizando el ensayo. Es decir que a medida que pasaba el tiempo y a mayor dosis de agua, se observó mayor pérdida de peso seco. Por lo tanto los tratamientos  $T_{W3-N0}$  y  $T_{W3-N60}$ , que representaban la condición óptima de dosis de agua, tuvieron la máxima degradación; mientras que los tratamientos  $T_{W1-N0}$  y  $T_{W1-N60}$ , que estaban bajo condición de sequía, mostraron la situación opuesta (mínima degradación). No se hallaron diferencias debidas a la fertilización.

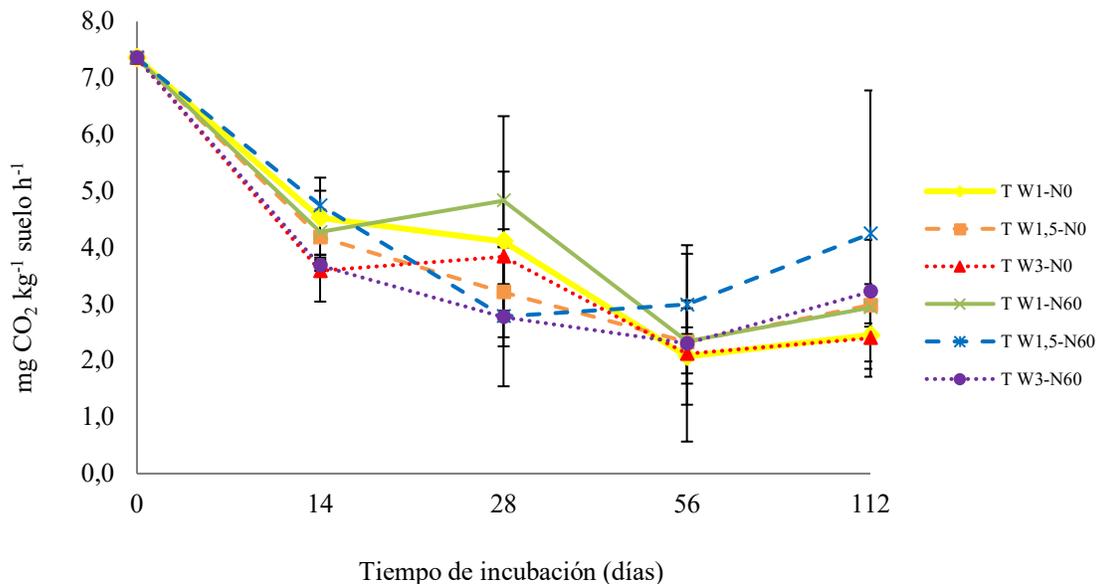


**Figura 5.4** Evolución en el tiempo de la pérdida de masa seca de rastrojo (g), bajo diferentes dosis de agua y fertilización. Las barras de error muestran  $\pm 1$  E.S. ( $n=3$ ).

### 5.3.2 Respiración Inducida por Sustrato

La SIR varió significativamente con el transcurso del tiempo ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 5.5**). En el primer muestreo, se observó una marcada disminución (43%) de la respuesta en comparación con los valores iniciales ( $7,352 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ ), esta disminución se sostuvo en el segundo y tercer muestreo, pero nunca superando aquella de las dos semanas; y hacia finales del ensayo SIR aumentó en todos los tratamientos. En esta determinación tampoco se detectaron diferencias significativas por efecto de la fertilización.

Debido a la posible interacción de los factores Tiempo y Dosis de agua ( $p = 0,0829$ ), se analizaron los datos en promedio para cada fecha, encontrando diferencias significativas en SIR debido a la dosis de agua a las 2 ( $p = 0,0082$ ) y 4 ( $p = 0,0667$ ) semanas de iniciado el ensayo. Se observó para ambos casos, que las dosis mayores de agua afectan negativamente a la respuesta SIR. A las 2 semanas los tratamientos con mayor dosis de agua ( $T_{W3-N0}$  y  $T_{W3-N60}$ ) tuvieron la respuesta SIR más baja ( $3,587$  y  $3,685 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ , respectivamente), y el resto de los tratamientos no se diferenciaron estadísticamente. A las 4 semanas los tratamientos bajo condiciones de sequía ( $T_{W1-N0}$  y  $T_{W1-N60}$ ) tuvieron la mayor respuesta SIR ( $4,113$  y  $4,834 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ , respectivamente).



**Figura 5.5** Respiración Inducida por Sustrato (SIR) ( $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ ) en el tiempo, bajo diferentes dosis de agua y fertilización. Las barras de error muestran  $\pm 1 \text{ E.S.}$  ( $n=3$ ).

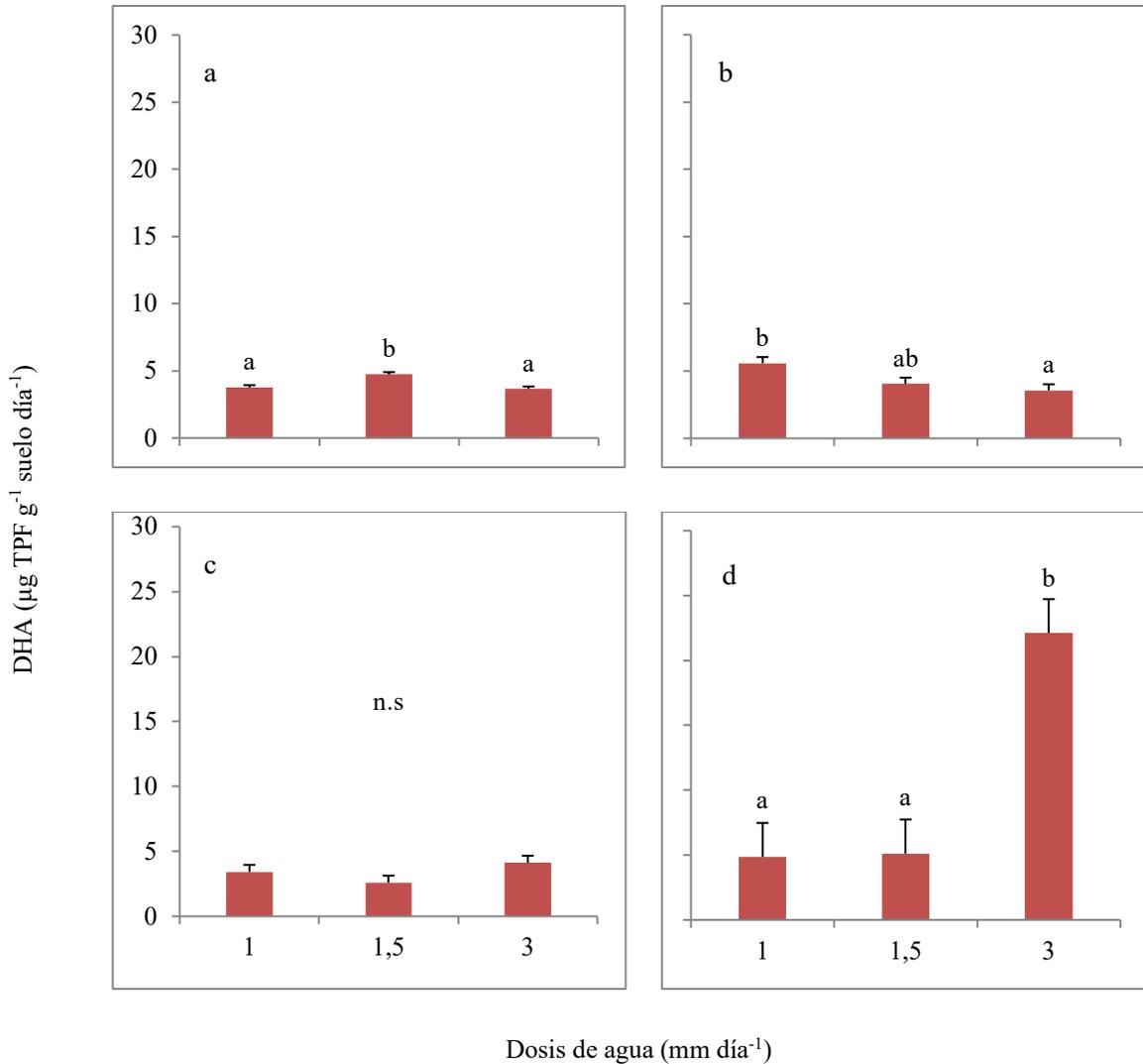
A los 112 días, se observa que el tratamiento  $T_{W1,5-N60}$  fue notoriamente mayor a los demás tratamientos, sin embargo no se detectaron diferencias significativas. Esto puede deberse a que una de las réplicas fue muy superior a las demás, generando un error estándar alto ( $2,533 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ ).

### 5.3.3 Actividad deshidrogenasa

El análisis de varianza para la DHA presentó interacciones significativas entre los factores ( $p < 0,0001$ ), por ello se analizaron los efectos principales (Dosis de agua y Fertilización) en forma separada para cada fecha de muestreo. Se observaron diferencias entre los tratamientos debido a la dosis de agua a las 2 ( $p=0,002$ ), 4 ( $p=0,0236$ ) y 16 ( $p=0,0052$ ) semanas de iniciado el ensayo (**Figura 5.6 a**, **Figura 5.6 b** y **Figura 5.6 d**, respectivamente), siendo mayor la actividad en los tratamientos con la dosis media de agua en los primeros 3 muestreos.

A las 16 semanas de ensayo, hubo un aumento significativo ( $p=0,0052$ ) de la DHA en  $T_{W3-N0}$  cuyo máximo valor llegó a  $39,03 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$  y el promedio fue de  $22,11 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ . A las 4 y 16 semanas hubo un aumento de DHA, y se obtuvieron los mayores valores bajo las dosis de agua 1 mm ( $5,58 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) y 1,5 mm ( $4,05 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ). Con el transcurso del tiempo los tratamientos se mantuvieron estables, en un rango que fue desde 2,47 hasta  $5,78 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ , a excepción del tratamiento  $T_{W3-N0}$  ya descrito.

No se observaron efectos significativos sobre DHA por aplicación de fertilizante nitrogenado ( $p=0,005$ ) en ninguno de los muestreos.



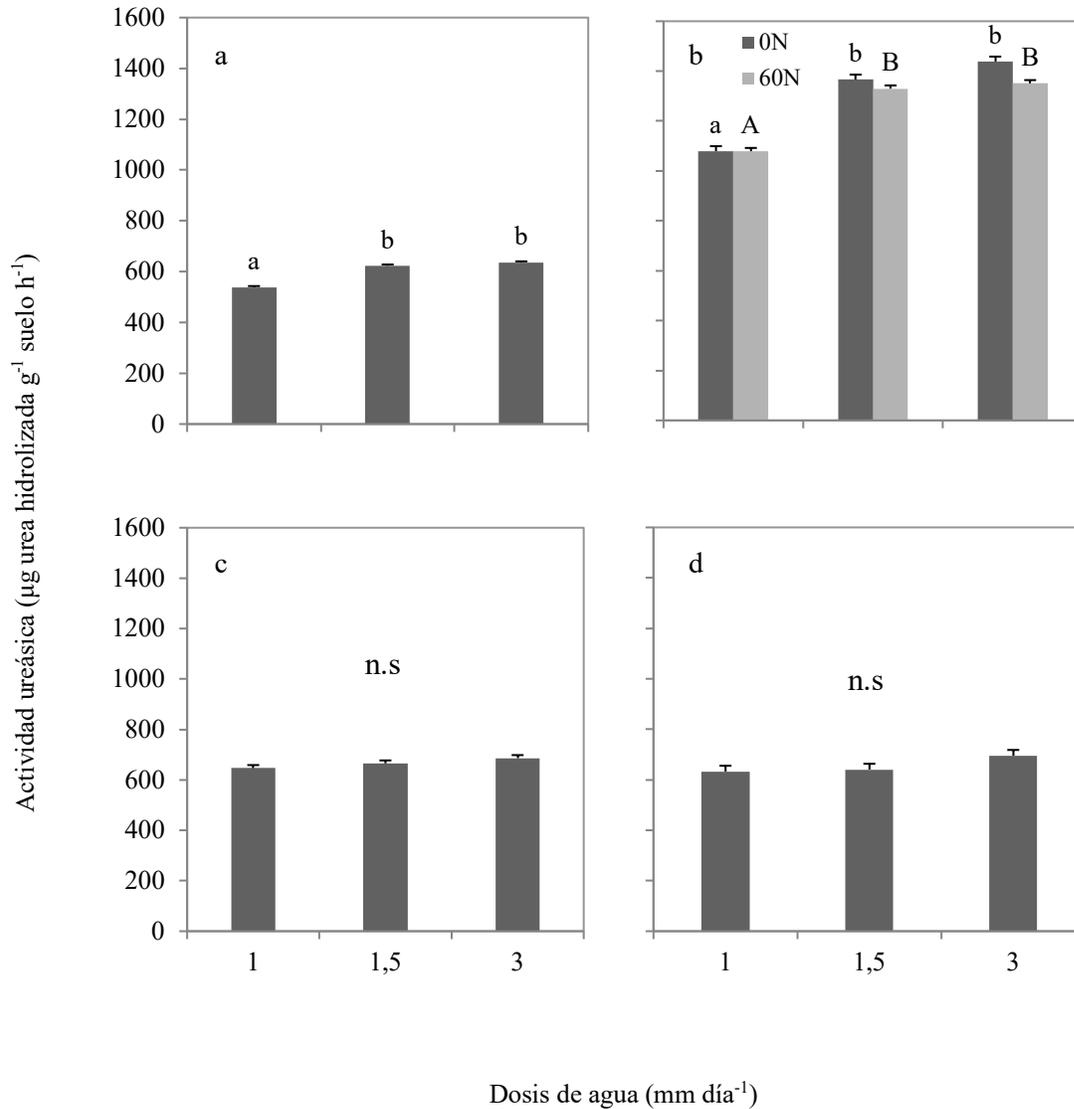
**Figura 5.6** Efecto de tres dosis de agua sobre la actividad deshidrogenasa (DHA) ( $\mu\text{g TPF g}^{-1}$  suelo  $\text{día}^{-1}$ ) a las 2, 4, 8 y 16 semanas (a, b, c y d, respectivamente) de iniciado el ensayo en microcosmos de suelo. Las barras representan  $+1$  E.S. ( $n=6$ ). Distintas letras representan diferencias significativas entre las dosis de agua, para cada etapa de muestreo.

### 5.3.4 Actividad ureásica

Durante toda la experiencia la UA fue elevada ( $534,87 - 1438,54 \mu\text{g urea hidrolizada g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ ) (**Figura 5.7**). Se observaron los valores más bajos al inicio del ensayo, y los más altos a las 4 semanas, ya que hubo un aumento considerable de la actividad ( $p < 0,0001$ ) bajo las tres condiciones hídricas, y tanto en los tratamientos fertilizados como no fertilizados. Se observó una posible interacción entre los factores ( $p=0,086$ ), por lo que se procedió a

evaluar el efecto de las dosis de agua y la fertilización nitrogenada, en cada etapa de muestreo.

A los 14 días de iniciado el ensayo se observó un efecto significativo ( $p < 0,0001$ ) de las dosis de agua sobre UA en los microcosmos. El rango de valores estuvo en 542,44 – 639,58  $\mu\text{g}$  urea hidrolizada  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ , siendo mayor la actividad a mayor dosis de agua.



**Figura 5.7** Efecto de tres dosis de agua sobre la actividad ureásica ( $\mu\text{g}$  urea hidrolizada  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ ) a las 2, 4, 8 y 16 semanas (a, b, c y d, respectivamente) de iniciado el ensayo en microcosmos de suelo. Las barras representan  $\pm 1$  E.S. ( $n=6$  para a, c y d;  $n=3$  para b). Distintas letras representan diferencias significativas entre las dosis de agua, para cada etapa de muestreo; en b) letras minúsculas para muestras sin fertilizar y letras mayúsculas para muestras fertilizadas. n.s.= no significativo.

A las 4 semanas de iniciado el ensayo se observó una posible interacción ( $p=0,0658$ ) entre los factores evaluados (Dosis de agua y Dosis de nitrógeno), por lo que se evaluó el efecto de las dosis de agua sobre la UA bajo los tratamientos sin fertilizar por un lado y fertilizados por otro. En ambas situaciones hubo efecto significativo de la dosis de agua ( $p<0,0001$ ), a mayor dosis de agua mayor actividad, con valores que fueron de 1079,16 a 1438,54  $\mu\text{g}$  urea hidrolizada  $\text{g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ . A las 8 y 16 semanas, no se observaron efectos significativos de la dosis de agua ( $p=0,1036$  y  $p=0,1527$ , respectivamente) ni de la dosis de nitrógeno ( $p=0,7666$  y  $p=0,2963$ , respectivamente) sobre la UA.

## 5.4. Discusión

El estudio llevado a cabo en microcosmos con suelos provenientes de parcelas bajo SD, permitió estudiar la actividad microbiana sobre la degradación de rastrojo. Se pudo evaluar el efecto que causan las diferentes dosis de agua y la aplicación de nitrógeno como fertilizante, sobre las actividades enzimáticas y la respiración inducida por sustrato bajo condiciones controladas de laboratorio.

La descomposición de los restos vegetales es un proceso clave en los ecosistemas debido a que influye sobre la construcción de la materia orgánica del suelo y la liberación de nutrientes para las plantas [180]. En este estudio, se observó que la degradación del rastrojo fue lenta para el período evaluado, pero a la vez fueron notorios los cambios con el transcurso del tiempo. El rastrojo de trigo es de lenta descomposición debido al alto contenido de lignina; y la humedad del suelo, la temperatura y el tiempo, son factores primordiales para que los microorganismos puedan llevar a cabo este proceso [181]. El marcado efecto de las dosis de agua, permite confirmar que la degradación del material vegetal es altamente dependiente de la disponibilidad de agua en el suelo. Esto mismo fue observado en ensayos de descomposición de restos vegetales en sitios en los que el contenido de agua varía estacionalmente: en la zona semiárida central Argentina [182], en la zona del Monte de Argentina [183] y en bosques alemanes [184]; y se han hallado las tasas más bajas de descomposición durante el verano, que es cuando el contenido de agua del rastrojo es más bajo. Otro factor importante en la degradación del rastrojo es la temperatura, que en este ensayo se mantuvo a 22 °C. En general, la tasa de descomposición

de rastrojo aumenta a mayores temperaturas, principalmente en sitios fríos [175]. La temperatura pudo haber sido otro factor que influyó en la lenta degradación, si se tiene en cuenta además que los suelos evaluados recibieron una nevada en el año 2009, hecho climático totalmente atípico para la zona. Además, no se observó ni inhibición ni estimulación de la actividad por incorporación de nitrógeno. Podría pensarse que los microorganismos de este tipo de suelos son capaces de degradar el rastrojo de trigo, dependiendo básicamente de la disponibilidad de agua y tiempo, sin dejar de considerar las fuentes de nitrógeno existentes de su propia biomasa y del suelo [185]. En concordancia con los resultados obtenidos, Kochsiek y Knops [186] encontraron muy poco efecto sobre la descomposición de hojarasca por adición de N, tanto en estudios a campo como en el laboratorio. Por otra parte, Richmond y Rillo [181] observaron una tendencia a una mayor descomposición del rastrojo de un cultivo de maíz, cuanto mayor fue el nitrógeno disponible y más tardía la aplicación del fertilizante.

Los datos obtenidos de SIR muestran un cambio fuerte con el transcurso del ensayo sobre todo en los dos primeros muestreos donde se observó una disminución significativa de SIR en los tratamientos con mayor dosis de agua. Cuando el contenido de agua del suelo está por debajo del nivel óptimo, se puede producir una menor disponibilidad de agua o la distribución no uniforme de la glucosa, la cual a su vez puede causar una disminución de la SIR. Cuando el contenido de agua en el suelo es superior al nivel óptimo, el menor suministro de oxígeno puede inhibir las actividades aeróbicas de los microorganismos, disminuyendo SIR [187]. Podría asumirse que la reducción de SIR observada en los primeros muestreos se debe a la limitación de oxígeno, que se produce cuando hay altos contenidos de agua en el suelo, y que reduce la respiración microbiana [188]; aunque la producción de CO<sub>2</sub> puede cambiar con la calidad del material orgánico [189], por lo que no se descarta que otros factores, como la alta relación C:N del residuo de trigo, hayan influido en la disminución de SIR, dado que este residuo no promueve una rápida colonización microbiana [190]. La respuesta SIR en todos los niveles de agua evaluados y durante todo el ensayo, estuvo por debajo de 5 mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suelo h<sup>-1</sup>; lo que supone que la microbiota del suelo experimenta un severo estrés cuando no se encuentra bajo condiciones óptimas [190], por ejemplo al pasar de condiciones secas a condiciones húmedas [191] y el resultado es la reducción del crecimiento o la muerte. Ante condiciones ambientales

extremas, como las acontecidas en la zona de muestreo de los suelos, el metabolismo y posiblemente la diversidad de los microorganismos se ve altamente afectado, y esto es determinante en la actividad general del suelo. Hacia el final del experimento, a los 4 meses de iniciada la experiencia, se observó un aumento de SIR para todos los tratamientos que coincidió con el momento de mayor pérdida de peso seco del rastrojo. Esto puede adjudicarse a que la mineralización de los compuestos más lábiles se produce en la etapa inicial de descomposición de los residuos (los primeros 3 meses), tal como lo comprobaron Arrigo y col. [189], quienes evaluaron la asociación entre el C respirado y la pérdida de peso de las hojas de diferentes especies arbóreas durante 360 días, y encontraron que la pérdida de peso fue mayor en los primeros 90 días. Además, otros factores pueden inducir este comportamiento: a) las condiciones fueron óptimas para la recuperación y crecimiento de las comunidades microbianas en general; b) la segunda fertilización en la séptima semana provocó un aumento de biomasa microbiana activa; c) aumento de la biomasa fúngica, capaz de producir enzimas que degradan moléculas complejas [190]. Estudios realizados en el laboratorio, en los cuales se estudió el efecto de diferentes herbicidas sobre la respuesta SIR, mostraron cierta inhibición de esta propiedad microbiológica por toxicidad directa sobre la comunidad microbiana, aunque con una recuperación en la tercer semana del período de incubación [95]. En este estudio, a pesar de que no se encontró un efecto estadísticamente significativo de la fertilización nitrogenada sobre SIR, se observó una tendencia de mejora de esta variable a los 112 días de iniciado el ensayo, resultados similares a los que observaron Thirukkumaran y Parkinson [192] en un ensayo con suelos de bosques de pino, donde hubo disminución de SIR a lo largo del ensayo (120 días) por aplicación de urea con leves mejorías. Mientras que diferentes autores han demostrado que ensayos a largo plazo con altas dosis de fertilización nitrogenada disminuyen SIR en suelos forestales [193, 194].

Las actividades enzimáticas son críticas para mantener la disponibilidad de nutrientes, y sus actividades son indicadoras de la función microbiana y de las condiciones físico-químicas del suelo [27].

En concordancia con otros estudios [128, 195], los resultados obtenidos en este ensayo para DHA, indican que la enzima no se ve afectada por la aplicación de fertilizante nitrogenado. Los fertilizantes aplicados al suelo pueden incrementar el rendimiento de los

cultivos y la actividad de los microorganismos pero también pueden disminuir la actividad de algunas enzimas [128], y a menudo se supone, que los fertilizantes inorgánicos tienen relativamente menos efecto sobre la actividad enzimática del suelo que los fertilizantes orgánicos [196]. La disponibilidad de agua afecta en gran medida la actividad microbiana del suelo, la composición de la comunidad, y en consecuencia la actividad enzimática del suelo. A medida que los suelos se secan, los potenciales de agua aumentan, y así tanto la actividad microbiana como la actividad de la enzima intracelular se ralentiza [197]. En el caso de los suelos húmedos, el aumento de humedad puede traer a la solución del suelo materia orgánica soluble, lo que puede llevar a un aumento del número de población bacteriana. Por lo tanto, se considera que los valores máximos de DHA en los perfiles de suelo están conectados indirectamente con el máximo de humedad del suelo [196]. Este estudio reveló diferencias en la actividad enzimática por efecto de las distintas dosis de agua en el suelo, pero detectando la mayor actividad en los tratamientos que recibieron la dosis de agua normal para los suelos estudiados ( $T_{W1,5-N0}$  y  $T_{W1,5-N60}$ ), lo que parece indicar que al no tener el nivel óptimo de agua en el suelo, los microorganismos se adaptan a esta condición. En este estudio no se observaron efectos significativos sobre DHA por aplicación de fertilizante mineral nitrogenado; mientras que otros autores han reportado tanto aumentos de DHA [198, 199], como disminuciones [200, 201] que pueden ser causadas por toxicidad directa y / o reducción del pH a causa de fertilizantes a base de amonio [192, 200]. Por lo tanto podría asumirse que el efecto de la fertilización sobre DHA estaría relacionado con el tipo de suelo, el clima, la historia de uso del suelo, la aplicación de fertilizante, entre otros. Por último, debe tenerse en cuenta la temperatura a la cual se realizó el ensayo (22°C), ya que la velocidad de la catálisis enzimática generalmente aumenta con el aumento de temperatura hasta la temperatura desfavorable, en el que la enzima se desnaturaliza. Sin embargo, a pesar que se sugiere 30 °C como la temperatura óptima para estimar la DHA del suelo [202], también se han estimado valores muy altos a 20 °C [196]. La relativa similitud de los datos a lo largo del ensayo, se atribuye a que la actividad enzimática puede estabilizarse durante períodos de incubación extendidos [166]. Sin embargo, en otros ensayos se ha observado una disminución de DHA luego de 5 días [203] y 8 semanas [204].

La ureasa, resulta de interés debido a su papel en la descomposición de los fertilizantes de urea en los sistemas agrícolas; y por lo tanto, se considera un agente importante para la mineralización de N en los sistemas terrestres y acuáticos [205]. El proceso de descomposición del rastrojo está influenciado por enzimas como la ureasa, y la actividad de la ureasa en el suelo parece ser principalmente el resultado de su liberación de la descomposición microbiana y células de plantas, que se asocia principalmente con la materia orgánica del suelo y los minerales de arcilla [206]. La UA parece estar correlacionada negativamente con el contenido de agua en el suelo [207, 208]. Esto sugiere que la pérdida de humedad de los suelos conduce a la liberación de ureasa desde sitios protegidos y que la ureasa entonces liberada es rápidamente degradada cuando los suelos son nuevamente humedecidos bajo condiciones aeróbicas o de saturación de agua [209]. Sin embargo, no siempre se ha informado de que la UA se correlacione negativamente con la disponibilidad de agua del suelo, y se ha demostrado que la sequía puede tener un efecto negativo en la actividad de las enzimas del suelo y por lo tanto en la disponibilidad de nutrientes [210]. En este estudio, se observó mayor UA en los tratamientos con mayor dosis de agua a las 2 y 4 semanas, mientras que no se observaron diferencias significativas por efecto del agua a las 8 y 16 semanas de iniciado el ensayo. En general en los tratamientos con mayor suministro de agua se observó mayor cantidad de urea hidrolizada, y esto coincide con varios trabajos consultados [210–212]. A las 4 semanas del ensayo se observó un incremento significativo de la UA. Esto podría atribuirse como consecuencia de la aplicación de la dosis de N a las 3 semanas de iniciado el ensayo, sin embargo el aumento se observó para todos los niveles de agua, y tanto en los tratamientos fertilizados como los no fertilizados. Esto coincide con trabajos de otros autores [128], que encontraron una tendencia de mayor actividad microbiana en parcelas fertilizadas, a pesar de que sus resultados no fueron diferentes estadísticamente entre tratamientos fertilizados y no fertilizados. Sin embargo, se han reportado efectos significativos de la fertilización sobre ureasa, tanto con fertilizante nitrogenado mineral como orgánico, y se ha determinado predominio de esta enzima en las fracciones más pequeñas del suelo, enriquecidas en biomasa microbiana y nitrógeno total [213].

## 5.5. Conclusiones

En los ambientes semiáridos del SO Bonaerense productores de trigo, los procesos de descomposición son muy lentos debido a que las condiciones climáticas no favorecen una elevada actividad microbiana, y se espera que entre los factores ambientales, la disponibilidad de agua en los valores normales de la región tenga la mayor importancia. En los suelos estudiados de la región semiárida de la provincia de Buenos Aires, la actividad microbiana estuvo influenciada principalmente por el contenido de las dosis de agua aplicadas al suelo y el aporte de rastrojo; pero no se observaron efectos de la fertilización sobre las variables evaluadas.

La magnitud de los cambios en los procesos microbianos estará influenciada directamente, por cualquier alteración en la comunidad microbiana o por la actividad de enzimas específicas de los microorganismos presentes. De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que la respiración inducida por sustrato, la actividad deshidrogenasa y la actividad ureásica, son variables sensibles a altos niveles de agua en el suelo, al menos hasta que los microorganismos se adapten a las nuevas condiciones del ambiente.

# CAPÍTULO 6

## CONCLUSIONES GENERALES

La evaluación de comunidades microbianas en suelos semiáridos del SOB bajo distintos sistemas de manejo agrícola, resulta de importancia para la región, en especial para el ensayo de labranzas muestreado, ya que brinda información a nivel microbiológico que representa el primer antecedente y complementa los existentes en el ensayo.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo han permitido validar parcialmente las hipótesis planteadas y llegar a una serie de conclusiones sobre la ecología microbiana de las comunidades funcionales en relación al efecto de los sistemas de manejo en el SOB.

*Hipótesis 1: La abundancia y actividad microbiana es menor en suelos que reciben disturbios por labranzas y/o por presencia de animales para pastoreo.*

Esta hipótesis se valida parcialmente dado que la abundancia de cada grupo microbiano fue similar ante las labranzas y el manejo del verdeo, excepto por casos puntuales. Las variaciones significativas que se detectaron en el número de microorganismos, estuvieron principalmente dadas por las fechas de muestreo, mostrando la importancia que tiene la estacionalidad en la región.

La actividad microbiana sí presentó variaciones entre los manejos de acuerdo a lo esperado (mayor actividad en SD y suelo no pastoreados) para la mayoría de los muestreos, especialmente en los primeros centímetros del suelo (para el caso de los muestreos del año 2011). La respiración microbiana tuvo fluctuaciones con eventos de mayor actividad que no se correspondieron con aumentos en densidad de los grupos analizados, reflejando la actividad de otros grupos microbianos como hongos y actinomicetes que no fueron evaluados por el método de cultivo utilizado.

*Hipótesis 2: La fertilización nitrogenada aumenta la abundancia de los grupos bacterianos nitrificadores, reductores de nitrato y desnitrificadores.*

Esta hipótesis no se valida debido a que la incorporación de fertilizante nitrogenado no afectó el número de bacterias nitrificadoras, reductoras de nitrato, ni desnitrificadoras en ninguna fecha de muestreo.

*Hipótesis 3: El pastoreo por su efecto en la compactación del suelo, favorece los procesos anaeróbicos, y por ende a la abundancia y diversidad de bacterias desnitrificantes.*

Esta hipótesis se valida parcialmente ya que el pastoreo no generó variación en la abundancia de bacterias desnitrificadoras sino que estas diferencias se vieron entre fechas de muestreos. Sí se observó variación en el tamaño de los fragmentos amplificados de los genes *nirK* y *nosZ* entre suelos pastoreados y no pastoreados, tanto en las muestras de suelos como en los aislamientos, y estos últimos también variaron en su forma de crecimiento y en el perfil fisiológico.

*Hipótesis 4: Durante la degradación de rastrojo, la actividad microbiana se ve favorecida por el incremento en el contenido de agua y nitrógeno en el suelo, y se refleja en un aumento en la actividad enzimática microbiana y la biomasa microbiana activa del suelo.*

Esta hipótesis se valida parcialmente, ya que la biomasa activa tuvo variaciones por efecto del contenido de agua al comienzo del ensayo, pero con un patrón inverso (a mayor contenido de agua, menor SIR) a lo esperado; y la actividad enzimática, en general fue mayor bajo las condiciones hídricas habituales de la zona o mayores; sin embargo no respondieron a la incorporación de fertilizante nitrogenado.

Desde el punto de vista microbiológico, para los suelos evaluados y bajo las condiciones descritas, los microorganismos parecen responder más a las variaciones de parámetros ambientales, como la variación de precipitaciones y/o temperaturas debido al marcado cambio estacional, que a los efectos de manejo.

Finalmente, se propone que en suelos frágiles como los del SOB es posible la incorporación de la SD como práctica de laboreo, y se recomienda prestar atención al manejo del verdeo, dado que el pastoreo, al favorecer el proceso de desnitrificación, puede provocar pérdidas de nitrógeno y generar gases de efecto invernadero.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] **Nawaz MF, Bourrié G, Trolard F** (2013) Soil compaction impact and modelling. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 33(2):291-309.
- [2] **Rusinamhodzi L, Corbeels M, van Wijk MT, Rufino MC, Nyamangara J, Giller KE** (2011) A meta-analysis of long-term effects of conservation agriculture on maize grain yield under rain-fed conditions. *Agronomy for Sustainable Development* 31(4):657-673.
- [3] **Gómez Z, Iglesias MC, Venialgo CA, Romero EG** (2004) Efectos de la siembra directa sobre la actividad biológica, en suelos de la zona oeste de la provincia de Chaco, ubicados en el dorsal agrícola subhúmedo. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE*.
- [4] **Kiessling RJ** (2012) Cambios en algunas propiedades químicas y físicas del suelo en sistemas productivos del sudoeste bonaerense: efecto del sistema de labranza, nivel de fertilización nitrogenada y pastoreo directo. *Tesis Magíster en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Sur*. Bahía Blanca, Argentina.
- [5] **Wikipedia La Enciclopedia Libre**. (2019). [Online]. Disponible en: <http://www.wikipedia.org/>. [Último acceso: 09-Mar-2019].
- [6] **FAO** (2011) Soil tillage in Africa: needs and challenges. *Food and Agriculture Organization of the UN. FAO Soils Bulletin No. 69, Roma, Italia*.
- [7] **Jaramillo DF, Rodriguez E, Diaz K** (2002) Introducción a la Ciencia del Suelo. Facultad de Ciencias, Universidad de Colombia. Medellín, Colombia.
- [8] **Costantini A, Cosentino D, Segat A** (1996) Influence of tillage systems on biological properties of a Typic Argiudoll soil under continuous maize in central Argentina. *Soil & Tillage Research* 38(3-4):265-271.
- [9] **Kassam A, Friedrich T, Derpsch R, Kienzle J** (2015) Overview of the Worldwide Spread of Conservation Agriculture. *Field Actions Science Reports* 8(8):1-8. [Online]. Disponible en: <http://journals.openedition.org/factsreports/3966>. [Último acceso: 04-Dic-2018].
- [10] **Nocelli Pac S** (2018) Evolución y retos de la Siembra Directa en Argentina. *Revista Red de Innovadores - Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (Aapresid)*, 162:12-15.
- [11] **Trigo E, Cap E, Malach V, Villarreal F** (2009) The case of zero-tillage technology in Argentina. *International Food Policy Research Institute*. 915:v + 32 p.
- [12] **Pérez Brandán C, Huidobro J, Conforto C, Arzeno JL, March G, Meriles J, Vargas Gil S** (2011) Impacto de los sistemas de labranza sobre indicadores biológicos de calidad de suelo. *INTA Documentos*.

- [13] **Díaz-Zorita M, Barraco M, Álvarez C** (2004) Efectos de doce años de labranzas en un Hapludol del noroeste de Buenos Aires, Argentina. *Ciencia del Suelo (Argentina)* 22(1):11-18.
- [14] **Malhi SS, Nyborg M, Goddard T, Puurveen D** (2011) Long-term tillage, straw and N rate effects on some chemical properties in two contrasting soil types in Western Canada. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 90(1):133-146.
- [15] **Abril A, Salas P, Lovera E, Kopps S, Casado-Murillo N** (2005) Efecto acumulativo de la siembra directa sobre algunas características del suelo en la región semiárida central de la Argentina. *Ciencia del Suelo (Argentina)* 23(2):179-188.
- [16] **Kiessling RJ, Galantini JA, Iglesias JO, Krüger HR, Venanzi S** (2008) Efecto del pisoteo animal sobre la porosidad del suelo en lotes bajo siembra directa continua. *XXI Congreso Argentino de la Ciencia del suelo. 13 a 16 de Mayo 2008*. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.
- [17] **Quiroga AR, Buschiazzo DE, Peinemann N** (1999) Soil compaction is related to management practices in the semi-arid Argentine pampas. *Soil Tillage and Research* 52(1-2):21-28.
- [18] **Liu T, Nan Z Hou F** (2011) Grazing intensity effects on soil nitrogen mineralization in semi-arid grassland on the Loess Plateau of northern China. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 91(1):67-75.
- [19] **Spargo JT, Cavigelli MA, Mirsky SB, Maul JE, Meisinger JJ** (2011) Mineralizable soil nitrogen and labile soil organic matter in diverse long-term cropping systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 90(2):253-266.
- [20] **Grageda-Cabrera OA, Vera-Núñez JA, Aguilar-Acuña JL, Macías-Rodríguez L, Aguado-Santacruz GA, Peña-Cabriales JJ** (2011) Fertilizer dynamics in different tillage and crop rotation systems in a Vertisol in Central Mexico. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 89(1):125-134.
- [21] **Pérez Brandán C, Huidobro J, Conforto C, Arzeno JL, March G, Meriles J, Vargas Gil S** (2011) Efecto de la rotación de cultivos sobre la diversidad de las comunidades microbianas del suelo cuantificada mediante PCR-TRFLP. *INTA Documentos*.
- [22] **Girvan MS, Bullimore J, Pretty JN, Mark Osborn A, Ball AS** (2003) Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69(3):1800-1809.
- [23] **Meriles JM, Vargas Gil S, Conforto C, Fioni G, Lovera E, March GJ, Guzmán CA** (2009) Soil microbial communities under different soybean cropping systems: Characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil Tillage and Research* 103(2):271-281.
- [24] **Díaz-Zorita M, Duarte GA, Grove JH** (2002) A review of no-till systems and soil management for sustainable crop production in the subhumid and semiarid Pampas of Argentina. *Soil & Tillage Research* 65(1):1-18.

- [25] **Galantini J, Rosell R** (2006) Long-term fertilization effects on soil organic matter quality and dynamics under different production systems in semiarid Pampean soils. *Soil & Tillage Research* 87(1):72-79.
- [26] **Insam H** (2001) Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* 100(3-4):389-402.
- [27] **Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G** (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54:655-670.
- [28] **Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G, Valori F** (2007) Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Ciencia del Suelo (Argentina)* 25:89-97.
- [29] **Garland JL, Mills AL** (1991) Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8):2351-2359.
- [30] **Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT** (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58(2):169-188.
- [31] **Jenkinson DS** (1976) The effects of biocidal treatments on metabolism in soil: IV. The decomposition of fumigated organisms in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 8(3):203-208.
- [32] **Anderson JPE, Domsch K** (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10(3):215-221.
- [33] **Zelles L, Bai QY, Beck T, Beese F** (1992) Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* 24(4):317-323.
- [34] **Petersen SO, Deboz K, Schjonning P, Christensen BT, Elmholt S** (1997) Phospholipid fatty acid profiles and C availability in wet-stable macro-aggregates from conventionally and organically farmed soils. *Geoderma* 78(3-4):181-196.
- [35] **Langenheder S, Lindström ES, Tranvik LJ** (2006) Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1):212-220.
- [36] **Patra AK, Abbadie L, Clays-Josserand A, Degrange V, Grayston SJ, Loiseau P y otros** (2005) Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecolo. Ecological Monographs* 75(1):65-80.
- [37] **Zumft G** (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(4):533-536.
- [38] **Jetten MS** (2001) New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems. *Plant and Soil* 230(1):9-19.
- [39] **Philippot L, Hallin S** (2006) Molecular analysis of soil denitrifying bacteria. En J. E. Cooper, & J. R. Rao (Eds.), *Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis*, pp 146-165. Oxfordshire, UK: CAB International.

- [40] **Whitehead DC** (2000) Nutrient elements in grassland. Introduction, en *Nutrient elements in grassland: soil-plant-animal relationships* Wallingford, UK.: CABI. pp. 1–14.
- [41] **Kowalchuk GA, Stephen JR** (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology* 55(1):485-529.
- [42] **Nyberg K, Schnürer A, Sundh I, Jarvis Å, Hallin S** (2006) Ammonia-oxidizing communities in agricultural soil incubated with organic waste residues. *Biology and Fertility of Soils* 42(4):315-323.
- [43] **Myrold DD** (2007) Quantification of nitrogen transformations. En CJ Hurst; RL Crawford; JL Garland; DA Lipson; AL Mills; LD Stetzenbach (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. 3° ed., pp. 687-696. Washington D.C.: ASM Press.
- [44] **Mertens J, Broos K, Wakelin SA, Kowalchuk GA, Springael D, Smolders E** (2009) Bacteria, not archaea, restore nitrification in a zinc-contaminated soil. *ISME Journal* 3:916-923.
- [45] **Junier P, Molina V, Dorador C, Hadas O, Kim O-S, Junier T y otros** (2010) Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(3):425-440.
- [46] **Insam H, Goberna M** (2013) Use of Biolog® for the Community Level Physiological Profiling (CLPP) of environmental samples. En: GA Kowalchuk, FJ Bruijn, IM Head, AD Akkermans, & JD van Elsas (Eds), *Molecular Microbial Ecology Manual*, pp. 853-860. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- [47] **Mertens J, Springael D, De Troyer I, Cheyns K, Wattiau P, Smolders E** (2006) Longterm exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environmental Microbiology* 8(12):2170-2178.
- [48] **Hendricks CW, Rhodes AN** (1992) Effect of glyphosate and nitrapyrin on selected bacterial populations in continuous-flow culture. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 4(3)9:417-424.
- [49] **Hernández M, Jia Z, Conrad R, Seeger M** (2011) Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* 78(3):511-518.
- [50] **Puglisi E, Vasileiadis S, Demiris K, Bassi D, Karpouzas D, Capri E y otros** (2012) Impact of fungicides on the diversity and function of non-target ammonia-oxidizing microorganisms residing in a litter soil cover. *Microbial Ecology* 64(3):692-701.
- [51] **Deni J, Penninckx MJ** (1999) Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology* 65(9):4008-4013.
- [52] **Shapleigh JP** (2013) Denitrifying Prokaryotes. En E. Rosenberg, & col (Eds.), *The Prokaryotes - Prokaryotic Physiology and Biochemistry*, pp. 405-425. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- [53] **Hallin S, Philippot L, Löffler FE, Sanford RA, Jones CM** (2018) Genomics and Ecology of Novel N<sub>2</sub>O-Reducing Microorganisms. *Trends in Microbiology* 26(1):43-55.
- [54] **Tiedje JM** (1994) Denitrifiers. En: A Klute (Ed.), *Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties. 2° Edition*, pp. 245-265. Madison, USA: SSSA.
- [55] **Ye RW, Thomas SM** (2001) Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology* 4(3):307-312.
- [56] **Philippot L, Hallin S, Schloter M** (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy* 96:249- 284.
- [57] **Deiglmayr K, Philippot L, Hartwig UA, Kandeler E** (2004) Structure and activity of the nitrate-reducing community in the rhizosphere of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* under long-term elevated atmospheric pCO<sub>2</sub>. *FEMS Microbiology Ecology* 49(3):445-454.
- [58] **Green SJ, Prakash O, Gihring TM, Akob DM, Jasrotia P, Jardine PM y otros** (2010) Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. *Applied and Environmental Microbiology* 76(10):3244-3354.
- [59] **van den Heuvel RN, van der Biezen E, Jetten MS, Hefting MM, Kartal B** (2010) Denitrification at pH 4 by a soil-derived Rhodanobacter-dominated community. *Environmental Microbiology* 12(12):3264-3271.
- [60] **McClain ME, Boyer EW, Dent CL, Gergel SE, Grimm NB, Groffman PM y otros** (2003) Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. *Ecosystems* 6(4):301-312.
- [61] **Vidon P, Allan C, Burns D, Duval TP, Gurwick N, Inamdar S y otros** (2010) Hot spots and hot moments in riparian zones: potential for improved water quality management. *Journal of the American Water Resources Association* 46(2):278-298.
- [62] **Enwall K, Throback IN, Stenberg M, Soderstrom M, Hallin S** (2010) Soil resources influence spatial patterns of denitrifying communities at scales compatible with land management. *Applied and Environmental Microbiology* 76(7):2243-2250.
- [63] **Baudoin E, Philippot L, Chèneby D, Chapuis-Lardy L, Fromin N, Bru D y otros** (2009) Direct seeding mulch-based cropping increases both the activity and the abundance of denitrifier communities in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry* 41(8):1703-1709.
- [64] **Fernández LA** (2007) Biodiversidad fenotípica de *Bradyrhizobium* sp. en suelos cultivados con soja y maíz: importancia en el agroecosistema. *Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur*. Bahía Blanca, Argentina.
- [65] **Venanzi S, Krüger HR, Galantini J, Iglesias, J** (2008) Rendimientos de trigo en el SO bonaerense. I - sistema de labranza y fertilización nitrogenada. *VII Congreso Nacional de Trigo. V Simposio Nacional de Cereales de Siembra Otoño-Invernal. I Encuentro del MERCOSUR, 2-4 de Julio* . Santa Rosa, La Pampa, Argentina.

- [66] **Kiessling RJ, Galantini JA, Iglesias JO, Krüger HR** (2010) Efecto del sistema de labranza y la fertilización nitrogenada sobre el carbono y nitrógeno edáfico en el suroeste bonaerense. *XXII Congreso Argentino de la Ciencia del suelo. 31 de Mayo a 4 de Junio de 2010*. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- [67] **Kiessling RJ, Galantini JA, Iglesias JO, Krüger HR** (2010) Sistemas de labranza en el suroeste bonaerense: Relación entre el carbono orgánico y algunas propiedades físicas del suelo. *XXII Congreso Argentino de la Ciencia del suelo. 31 de Mayo a 4 de Junio de 2010*. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- [68] **Krüger HR, Venanzi S, Minoldo G, Galantini JA** (2011) *Rendimientos de trigo en el SO Bonaerense. II Efectos de rotación y fertilización nitrogenada*. Obtenido de <http://inta.gob.ar/documentos/rendimientos-de-trigo-en-el-so-bonaerense.-ii-efectos-derotacion-y-fertilizacion-nitrogenada/>
- [69] **Doran JW, Parkin TB** (1994) Defining an assessing soil quality. En J. W. Doran, D. C. Coleman, D. F. Bezdieck, & B. A. Stewart (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, pp. 3-21. Madison, WI: SSSA Special Publication.
- [70] **Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Leirós M, Seoane S** (2005) Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* 37(5):877-887.
- [71] **Rotenberg D, Jiménez Wells A, Chapman EJ, Whitfield AE, Goodman RM, Cooperband LR** (2007) Soil properties associated with organic matter-mediated suppression of bean root rot in field soil amended with fresh and composted paper mill residuals. *Soil Biology and Biochemistry* 39(11):2936-2948.
- [72] **Nannipieri P** (1994) The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. En CE Pankhurst; BM Doube; WS Gupta; PR Grace (Eds.), *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*, pp. 238-244. Australia: CSIRO.
- [73] **Bolinder MA, Angers DA, Gregorich EG, Carter MR** (1999) The response of soil quality indicators to conservation management. *Canadian Journal of Soil Science* 79(1):37-45.
- [74] **Alef K, Nannipieri P** (1995) *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London, UK: Academic Press.
- [75] **García C, Gil-Sotres F, Hernández T, Trasar-Cepeda C** (2003) *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros.
- [76] **Zibilske LM** (1994) Carbon mineralization. En RW Weaver; S Angle; P Bottomley (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*, pp. 835-863. Madison, USA: SSSA.
- [77] **Anderson JPE** (1982) Soil respiration. En: R.H. Page, R.H. Miller & D.R. Keeney. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, pp. 837-871. Madison, USA: SSSA.

- [78] **Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Stewart G** (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology* 5:539-554.
- [79] **Philippot L, Hallin S** (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying community as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology* 8(3):234-239.
- [80] **Gardner WH** (1986) Water content. En A. Klute (Ed.), *Methods of soil analysis. Parte 1. Physical and mineralogical methods* (2 ed.). Madison, WI: SSSA.
- [81] **Bremner JM** (1965) Inorganic Forms of Nitrogen. En: A.G. Norman (Ed), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, pp. 1179-1237. Madison, USA: SSSA.
- [82] **Rowe R, Todd R, Waide J** (1977) Microtechnique for most probable number analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 33(3):675-680.
- [83] **Fadin JF** (1980) Prueba de reducción del nitrato. En *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, pp.142-147. Buenos Aires, Ed. Panamericana.
- [84] **Roux-Michollet D, Czarnes S, Adamb B, Berry D, Commeaux C, Guillaumaud N y otros** (2008) Effects of steam disinfection on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7):1836-1845.
- [85] **Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, Hallet S, Germon JC** (2002) Molecular Analysis of the Nitrate-Reducing Community from Unplanted and Maize-Planted Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 68(12):6121-6128.
- [86] **Throbäck I, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S** (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* 49(3):401-417.
- [87] **Delamuta MJR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M** (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:3342-3351.
- [88] **Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W** (1997) The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural AmmoniaOxidizing Populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63(12):4704-4712.
- [89] **Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP** (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10):3769-3775.
- [90] **Henry S, Bru D, Stres B, Hallet S, Philippot L** (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA,

- narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72(8):5181-5189.
- [91] **Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW** (2013) Infostat - Software estadístico, versión 2013, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- [92] **Acevedo E, Silva P** (2003) Agronomía de la cero labranza. Santiago, Universidad de Chile Facultad de Ciencias Agronómicas, Serie Ciencias agronómicas N° 10, p. 118.
- [93] **Gajda AM** (2010) Microbial activity and particulate organic matter content in soils with different tillage system use. *International Agrophysics* 24(2): 129-137.
- [94] **Gómez MA, Krüger HR, Sagardoy MA** (1996) Actividad biológica en un suelo de la zona semiárida Bonaerense cultivado con la secuencia soja-trigo bajo tres prácticas culturales. *Ciencia del Suelo* 14(1):37-41.
- [95] **Zabaloy MC** (2009) Evaluación integrada del impacto de herbicidas sobre las comunidades microbianas de suelos agrícolas. *Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur*. Bahía Blanca, Argentina.
- [96] **Silberman JE** (2016) Diversidad microbiana y materia orgánica del suelo en sistemas silvopastoriles de la Región chaqueña. *Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata*. La Plata, Argentina.
- [97] **Álvarez CR, Taboada MA, Bustingorri C, Gutiérrez B, Flavio H** (2006) Descompactación de suelos en siembra directa: efectos sobre las propiedades físicas y el cultivo de maíz. *Ciencia del Suelo (Argentina)* 24:1-10.
- [98] **Matulewich VA, Strom PF, Finstein MS.** (1975) Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. *Applied Microbiology* 29(2):265-268.
- [99] **MacDonald RM** (1986) Nitrification in soil: an introductory history, en J. I. Prosser (Ed) *Nitrification*, Special Publications of the Society for General Microbiology, Oxford, 20:1-16.
- [100] **Froni L** (2011) Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires. p. 744.
- [101] **Norton JM, Alzerreca JJ, Suwa Y, Klotz MG** (2002) Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology* 177(2):139-149.
- [102] **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(12):5410-5418.
- [103] **Munroe JW, McCormick I, Deen W, Dunfield KE** (2016) Effects of 30 Years of Crop Rotation and Tillage on Bacterial and Archaeal Ammonia Oxidizers. *Journal of Environmental Quality* 45(3):940-948.

- [104] **Pan H, Liu H, Liu Y, Zhang Q, Luo Y, Liu X y otros** (2018) Understanding the relationships between grazing intensity and the distribution of nitrifying communities in grassland soils. *Science of the Total Environment* 634:1157–1164.
- [105] **Liu J, Zhang Q, Li Y, Di H, Xu J, Li J y otros** (2016) Effects of pasture management on soil fertility and microbial communities in the semi-arid grasslands of Inner Mongolia. *Journal of Soils Sediments* 16(1):235-242.
- [106] **Gamble TN, Betlach HR, Tiedje JM** (1977) Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Applied and Environmental Microbiology* 33(4):926-939.
- [107] **Chèneby D, Philippot L, Hartmann A, Hénault C, Germon J-C** (2000) 16S DNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agriculture soils. *FEMS Microbiology Ecology* 34(2):121-128.
- [108] **Fernández LA, Perotti EB, Sagardoy MA, Gómez MA** (2008) Denitrification activity of Bradyrhizobium sp. isolated from Argentine soybean cultivated soils. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24(11):2577-2585.
- [109] **Vercellino M, Gómez MA** (2013) Denitrifying capacity of rhizobial strains of Argentine soils and herbicide sensitivity. *Annals of Microbiology* 63(4):1563-1570.
- [110] **Rinland ME** (2015) Biodegradación anaeróbica del residuo de la producción de cebolla del valle bonaerense del río colorado. *Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.*
- [111] **Tuomainen JM, Hietanen S, Kuparinen J, Martikainen PJ, Servomaa K** (2003) Baltic sea cyanobacterial bloom contains denitrification and nitrification genes, but has negligible denitrification activity. *FEMS Microbiology Ecology* 45(2):83-96.
- [112] **Wolsing M, Prieme A** (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments. *FEMS Microbiology Ecology* 48(2):261-271.
- [113] **Philippot L, Čuhel J, Saby NPA, Chèneby D, Chroňáková A, Bru D y otros** (2009) Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community. *Environmental Microbiology* 11(6):1518-1526.
- [114] **Matheson CD, Gurney C, Esau N, Lehto R** (2010) Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal* 3(1):38-45.
- [115] **Espinosa Asuar L** (2007) Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular*, pp. 517–540. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- [116] **Salerno CM, Montero MC, Sagardoy MA** (1997) Dynamics of bacteria from the phyllosphere and leaves of soy (*Glycine max* L. Merrill) in field conditions. *Revista Argentina de Microbiología* 29(3):122-130.

- [117] **Philippot L, Hojberg O** (1999) Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1446(1-2):1-23.
- [118] **Jha N** (2015) The influence of soil parameters and denitrifiers on N<sub>2</sub>O emissions in New Zealand dairy-grazed pasture soils. *Tesis Doctoral. Massey University Palmerston North New Zealand*. Palmerston North Nueva Zelanda.
- [119] **Wang Y, Lu S, Xiang Q, Yu X, Zhao K, Zhang X y otros** (2017) Responses of N<sub>2</sub>O reductase gene (*nosZ*)-denitrifier communities to long-term fertilization follow a depth pattern in calcareous purplish paddy soil. *Journal of Integrative Agriculture* 16(11): 2597–2611.
- [120] **Wang Y, Uchida Y, Shimomura Y, Akiyama H, Hayatsu M** (2017) Responses of denitrifying bacterial communities to short-term waterlogging of soils. *Scientific Reports* 7:1-13.
- [121] **Pan H, Li Y, Guan X, Li J, Xu X, Liu J y otros** (2016) Management practices have a major impact on nitrifier and denitrifier communities in a semiarid grassland ecosystem. *Journal of Soils Sediments* 16(3):896–908.
- [122] **Kloos K, Mergel A, Rösch C, Bothe H** (2001) Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology* 28(9):991-998.
- [123] **Ford DJ, Cookson WR, Adams MA, Grierson PF** (2007) Role of soil drying in nitrogen mineralization and microbial community function in semi-arid grasslands of north-west Australia. *Soil Biology and Biochemistry* 39(7):1557-1569.
- [124] **Xu L, Baldocchi DD, Tang, J** (2004) How soil moisture, rain pulses, and growth alter the response of ecosystem respiration to temperature. *Global Biogeochemical Cycles* 18(4):1-10.
- [125] **Barnard RM, Osborne CA, Firestone MK** (2013) Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. *The ISME Journal* 7(11):1-13.
- [126] **Chowdhury N, Burns RG, Marschner P** (2011) Recovery of soil respiration after drying. *Plant Soil* 348(1-2):269–279.
- [127] **Harper CW, Blair JM, Fay PA, Knapp AK, Carlisle JD** (2005) Increased rainfall variability and reduced rainfall amount decreases soil CO<sub>2</sub> flux in a grassland ecosystem. *Global Change Biology* 11(2):322–334.
- [128] **Toresani S, Bonel B, Ferreras L, Magra G, Dickie MJ, Galarza C, Faggioli V** (2009) Indicadores biológicos, físicos y químicos del suelo en sistemas de labranza y fertilización. *Para mejorar la producción. INTA EEA Oliveros* 42:77-81.
- [129] **Álvarez RO, Diaz RA, Barbero N, Santanatoglia OJ, Blotta L** (1995) Soil organic carbon, microbial biomass and CO<sub>2</sub>-C production from three tillage systems. *Soil & Tillage Research* 33(1):17-28.
- [130] **Iovieno P, Bååth E** (2008) Effect of drying and rewetting on bacterial growth rates in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 65(3):400-407.

- [131] **Conant RT, Dalla-Betta P, Klopatek CC, Klopatek JM** (2004) Controls on soil respiration in semiarid soils. *Soil Biology and Biochemistry* 36(6):945-951.
- [132] **Iocoli GA, Gómez MA** (2014) Incremento de la actividad biológica del suelo y del desarrollo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) luego de la aplicación de digerido anaeróbico. *XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. II Reunión Nacional "Materia Orgánica y Sustancias Húmicas". 5 al 9 de mayo de 2014*. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
- [133] **Bongiovanni MD, Bonacci A** (2014) Actividad biológica global en suelos bajo diferentes usos en departametro río cuarto. *XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. II Reunión Nacional "Materia Orgánica y Sustancias Húmicas". 5 al 9 de mayo de 2014*. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
- [134] **Bertram JE, Orwin KH, Clough TJ, Condrón LM, Sherlock RR, O'Callaghan M** (2012) Effect of soil moisture and bovine urine on microbial stress. *Pedobiologia* 55(4):211-218.
- [135] **Power JF, Peterson GA** (1998) Nitrogen transformations, utilization, and conservation as affected by fallow tillage method. *Soil & Tillage Research* 49(1-2):37-47.
- [136] **Aita C, Giacomini SJ** (2003) Decomposição e liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura de solo solteiras e consorciadas<sup>(1)</sup>. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 27(4):601-612.
- [137] **Montaño NM, Sandoval-Pérez AL, Nava-Mendoza M, Sánchez-Yañez JM, GarcíaOliva F** (2013) Variación espacial y estacional de grupos funcionales de bacterias cultivables del suelo de un bosque tropical seco en México. *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 61(1): 439-453.
- [138] **Benintende S, Benintende M, Sterren M, Saluzzio M, Barbagelata P** (2015) Biological variables as soil quality indicators: Effect of sampling time and ability to classify soils by their suitability. *Ecological Indicators* 52:147-152.
- [139] **Pichinoty F, Garcia JL, Job C, Durand M** (1978) Denitrification by *Bacillus licheniformis*. *Canadian Journal of Microbiology* 24(1):45-49.
- [140] **Shoun H, Kano M, Baba I, Takaya N** (1998) Denitrification by actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. *Journal of Bacteriology* 180(17):4413-4415.
- [141] **Mancinelli RL, Hochstein LI** (1986) The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 35(1):55-58.
- [142] **Kobayashi M, Matsuo Y, Takimoto A, Suzuki S, Maruo F, Shoun H** (1996) Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *Journal of Biological Chemistry* 271(27):16263-16267.
- [143] **Payne WJ** (1976) Denitrification. *Trends in Biochemical Sciences* 1(4):220-222.
- [144] **Bothe H, Jost G, Schloter M, Ward BB, Witzel K** (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* 24(5):673-690.

- [145] **Philippot L** (2005) Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochemical Society Transactions* 33(1):200-204.
- [146] **Garland JL** (1997) Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 24(4): 289-300.
- [147] **Lane D** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. En: E. Stackebrandt, M. Good-fellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-148. Wiley, New York.
- [148] **Gürtler V, Stanisich VA** (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. *Microbiology* 142(1):3-16.
- [149] **Goberna M, Insam H, Pascual JA, Sánchez J** (2005) Storage effects on the community level physiological profiles of Mediterranean forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 37(1):173-178.
- [150] **Lindstrom JE, Barry RP, Braddock JF** (1998) Microbial community analysis: A kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. *Soil Biology and Biochemistry* 30(2):231-239.
- [151] **Rastogi G, Sani RK** (2011) Chapter 2: Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. En: I Ahmad, F Ahmad, J Pichtel (Eds.), *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, pp. 29-57. Springer, Hardcover.
- [152] **Chèneby D, Perrez S, Devroe C, Hallet S, Couton Y, Bizouard F y otros** (2004) Denitrifying bacteria in bulk and maize-rhizospheric soil: diversity and N<sub>2</sub>O-reducing abilities. *Canadian Journal of Microbiology* 50(7):469-474.
- [153] **Ranjard L, Poly F, Nazaret S** (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* 151(3):167-177.
- [154] **Kwiatkowski AV, Laratta WP, Toffanin A, Shapleigh JP** (1997) Analysis of the role of the *nnrR* gene product in the response of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 to exogenous nitric oxide. *Journal of Bacteriology* 179(17):5618-5620.
- [155] **Roco CA, Bergaust LL, Bakken LR, Yavitt JB, Shapleigh JP** (2016) Modularity of nitrogen-oxide reducing soil bacteria: linking phenotype to genotype. *Environmental Microbiology* 19(6):2507-2519.
- [156] **Toffanin A, Wu Q, Maskus M, Casella S, Abrun HD, Shapleigh JP** (1996) Characterization of the gene encoding nitrite reductase and the physiological consequences of its expression in the nondenitrifying *Rhizobium "hedysari"* strain HCNT1. *Applied and Environmental Microbiology* 62(11):4019-4025.
- [157] **Basaglia M, Toffanin A, Baldan E, Bottegal M, Shapleigh JP, Casella S** (2007) Selenitereducing capacity of the copper-containing nitrite reductase of *Rhizobium sultae*. *FEMS Microbiology Letters* 269(1):124-130.
- [158] **Korbie DJ, Mattick JS** (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols* 3(9):1452-1456.

- [159] **Rösch Ch, Mergel A, Bothe H** (2002) Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8):3818-3829.
- [160] **Stres B, Mahne I, Avguštin G, Tiedje JM** (2004) Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1):301-309.
- [161] **Stewart FJ, Cavanaugh CM** (2007) Intragenomic Variation and Evolution of the Internal Transcribed Spacer of the rRNA Operon in Bacteria. *Journal of Molecular Evolution* 65(1):44-67.
- [162] **Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB y otros** (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7(7):514-525.
- [163] **Yoon JH, Kang S-J, Schumann P, Oh TK** (2007) *Cellulosimicrobium terreum* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(11):2493-2497.
- [164] **Qi Z, Zhang X-H, Boon N, Bossier P** (2009) Probiotics in aquaculture of China - Current state, problems and prospect. *Aquaculture* 290(1-2):15-21.
- [165] **Lavelle PE, Blanchart A, Martin A, Spain F, Toutain I, Barois I y otros** (1993) Hierarchical model for decomposition in terrestrial ecosystems: application to soils of the humid tropics. *Biotropica* 25(2):130-150.
- [166] **Sajjad MH, Lodhi A, Azam F** (2002) Changes in enzyme activity during the decomposition of plant residues in soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5(9):952-955.
- [167] **Nannipieri P, Grego S, Ceccanti B** (1990) Ecological significance of the biological activity in soil. En J. M. Bollag, & G. Stotzky (Eds.), *Soil Biochemistry. Vol. 6*, pp. 293-355. New York, NY, USA: Marcel Dekker.
- [168] **García C, Hernández T, Costa F, Ceccanti B** (1994) Biochemical parameters in soil regenerated by the addition of organic wastes. *Waste Management & Research* 12(6): 457-466.
- [169] **Shaw LJ, Burns RG** (2006) Enzyme Activity Profiles and Soil Quality. En J Bloem; DW Hopkins; A Benedetti (Eds.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*, pp. 158-170. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- [170] **Tabatabai MA** (1994) Soil enzymes. En RW Weaver; S Angle; P Bottomley (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*, pp. 775-833. Madison, USA: SSSA.
- [171] **Zabaloy MC, Garland JL, Gómez MA** (2008) An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology* 40(1):1-12.

- [172] **Höper H** (2006) Substrate-induced Respiration. En: J. Bloem, D. W. Hopkins, & A. Benedetti (Eds.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*, pp. 84-92. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- [173] **Sánchez B, Ruiz M, Ríos MM** (2005) Materia orgánica y actividad biológica del suelo en relación con la altitud, en la cuenca del río Maracay, estado Aragua. *Agronomie Tropicale* 55(4):507-534.
- [174] **Schjonning P, Thomsen J, Moberg P, de Jorge H, Kreisensen K, Christensen B** (1999) Turnover of organic matter in differently textured soils: I Physical characteristics of structurally disturbed and intact soils. *Geoderma* 89(3-4):177-198.
- [175] **He X, Lin Y, Han G, Guo P, Tian X** (2010) The effect of temperature on decomposition of leaf litter from two tropical forests by a microcosm experiment. *European Journal of Soil Biology* 46(3-4):200-207.
- [176] **Creus C, Studdert G, Echeverría H, Sánchez S** (1998) Descomposición de residuos de cosecha de maíz y dinámica del nitrógeno en el suelo. *Ciencia del Suelo (Argentina)* 16:51-57.
- [177] **Gallardo A, Merino J** (1993) Leaf decomposition in two Mediterranean ecosystems of southwest Spain: Influence of substrate quality. *Ecology* 74(1):152-161.
- [178] **Ibrahim A, Gillon D, Joffre R** (2010) Leaf litter decomposition of Mediterranean tree species in relation to temperature and initial water imbibitions under microcosm experiments. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 6(1):32-39.
- [179] **Horwath WR, Paul EA** (1994) Microbial biomass. En: S. Angle, R. Weaver, P. Bottomley, D. Bezdecik, S. Smith, A. Tabatabai, y otros (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*, pp. 753-773. Madison, USA: SSSA.
- [180] **Prescott CE** (2005) Do rates of litter decomposition tell us anything we really need to know? *Forest Ecology Management* 220(1-3):66-74.
- [181] **Richmond PF, Rillo SN** (2009) Caracterización de la dinámica de incorporación de residuos de cosecha al suelo en un sistema agrícola en siembra directa en el centro-oeste de Buenos Aires. *IPNI Informaciones Agronómicas* 43:22-26.
- [182] **Casado-Murillo N, Abril A** (2013) Decomposition and Carbon Dynamics of Crop Residue Mixtures in a Semiarid Long Term No-Till System: Effects on Soil Organic Carbon. *The Open Agriculture Journal* 7(1):11-21.
- [183] **Noe L, Abril A** (2008) Interacción entre calidad de restos vegetales, descomposición y fertilidad del suelo en el desierto del Monte de Argentina. *Ecología Austral* 18(2):181-193.
- [184] **Dilly O, Munch J-C** (1996) Microbial biomass content, basal respiration and enzyme activities during the course of decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (L.) gaertn.) forest. *Soil Biology and Biochemistry* 28(8):1073-1081.
- [185] **Wardle DA, Yeates GW, Nicholson KS, Bonner KI, Watson RN** (1999) Response of soil microbial biomass dynamics, activity and plant litter decomposition to agricultural intensification over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry* 31(12):1707-1720.

- [186] **Kochsiek AE, Knops JMH** (2013) Effects of Nitrogen Availability on the Fate of LitterCarbon and Soil Organic Matter Decomposition. *British Journal of Environment & Climate Change* 3(1):24-43.
- [187] **Cheng W, Coleman DC** (1989) A simple method for measuring CO<sub>2</sub> in a continuous airflow system: modifications to the substrate-induced respiration technique. *Soil Biology and Biochemistry* 21(3):385-388.
- [188] **Lin Q, Brookes PC** (1999) An evaluation of the substrate-induced respiration method. *Soil Biology and Biochemistry* 31(14):1969-1983.
- [189] **Arrigo NM, Jiménez MP, Effron D, Defrieri R** (2002) Carbono de respiración de un suelo forestal y su relación con la calidad de la hojarasca. *Agricultura Técnica* 62:331-338.
- [190] **Schomberg HH, Steiner JL** (1997) Estimating crop residue decomposition coefficients using Substrate-Induced Respiration. *Soil Biology and Biochemistry* 29(7):1089-1097.
- [191] **Halverson LJ, Jones TM, Firestone MK** (2000) Release of Intracellular Solutes by Four Soil Bacteria Exposed to Dilution Stress. *Soil Science Society of America Journal* 64(5):1630-1637.
- [192] **Thirukkumaran CM, Parkinson D** (2000) Microbial respiration, biomass, metabolic quotient and litter decomposition in a lodgepole pine forest floor amended with nitrogen and phosphorous fertilizers. *Soil Biology and Biochemistry* 32(1):59-66.
- [193] **Smolander A, Kurka A, Kitunen V, Mälkönen E** (1994) Microbial biomass C and N, and respiratory activity in soil of repeatedly limed and N- and P-fertilized norway spruce stands. *Soil Biology and Biochemistry* 26(8):957-962.
- [194] **Wallenstein MD, McNulty S, Fernandez IJ, Boggs J, Schlesinger WH** (2006) Nitrogen fertilization decreases forest soil fungal and bacterial biomass in three long-term experiments. *Forest Ecology and Management* 222(1-3):459-468.
- [195] **Roldán A, Salinas-García JR, Alguacil MM, Caravaca F** (2005) Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. *Applied Soil Ecology* 30(1):11-20.
- [196] **Wolińska A, Stępniewska Z** (2012) Chapter 8: Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. En: Canuto, R.A. (Ed.). *Dehydrogenases* (págs. 183-210). ISBN: 978-953-307-019-3, InTech, DOI: 10.5772/48294.
- [197] **Geisseler D, Horwath W, Scow K** (2011) Soil moisture and plant residue addition interact in their effect on extracellular enzyme activity. *Pedobiologia* 54(2):71-78.
- [198] **Chu HY, Hosen Y, Yagi K, Okada K, Ito O** (2005) Soil microbial biomass and activities in a Japanese Andisol as affected by controlled release and application depth of urea. *Biology and Fertility of Soils* 42(2):89-96.
- [199] **Ebhin Mastro R, Chhonkar PK, Singh D, Patra AK** (2006) Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a sub-tropical inceptisol. *Soil Biology and Biochemistry* 38(7):1577-1582.

- [200] **Hopkins DW, Shiel RS** (1996) Size and activity of soil microbial communities in longterm experimental grassland plots treated with manure and inorganic fertilizers. *Biology and Fertility of Soils* 22(1-2):66-70.
- [201] **Bittman B, Forge TA, Kowalenko CG** (2005) Response of the bacterial and fungal biomass in a grassland soil to multi-year applications of dairy manure slurry and fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry* 37(4):613-623.
- [202] **Cirilli F, Bellincontro A, De Santis D, Botondi R, Colao M, Muleo R, Mencarelli F** (2012) Temperature and water loss affect DHA activity and gene expression in grape berry during postharvest dehydration. *Food Chemistry* 132(1):447-454.
- [203] **Lodhi A, Malik NN, Mahmood T, Azam F** (2000) Response of soil micro flora, microbial biomass and some soil enzymes to Baythroid (an insecticide). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3(5):868-871.
- [204] **Azam F, Malik KA** (1985) Transformation of *Leptochloa fusca* and *Sesbania aculeata* in soil under different conditions. *Pakistan Journal of Soil Sciences* 1:3-13.
- [205] **Sinsabaugh RL, Reynolds H, Long TM** (2000) Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. *Soil Biology and Biochemistry* 32(14):2095-2097.
- [206] **Wu F, Jia Z, Wang S, Chang SX, Startsev A** (2012) Contrasting effects of wheat straw and its biochar on greenhouse gas emissions and enzyme activities in a Chernozemic soil. *Biology and Fertility of Soils* 49(5):555-565.
- [207] **Montero FA** (2000) Microbiología y bioquímica de suelos cultivados bajo siembra directa. *Tesis Magister. Universidad Nacional del Sur*. Bahía Blanca, Argentina.
- [208] **Pascual I, Antolín MC, García C, Polo A, Sánchez-Díaz M** (2007) Effect of water deficit on microbial characteristics in soil amended with sewage sludge or inorganic fertilizer under laboratory conditions. *Bioresource Technology* 98(1):29-37.
- [209] **Zantua MI, Bremner JM** (1977) Stability of urease in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 9(2): 135-140.
- [210] **Sardans J, Peñuelas J** (2005) Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology and Biochemistry* 37(3):455-461.
- [211] **Sahrawat KL** (1983) Relationships between soil urease activity and other properties of some tropical wetland rice soils. *Fertilizer Research* 4(2):145-150.
- [212] **Sardans J, Peñuelas J, Estiarte M** (2008) Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology* 39(2):223-235.
- [213] **Kandeler E, Stemmer M, Klimanek E-M** (1999) Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biology and Biochemistry* 31(2):261-273.

# ANEXO

## Lista de Tablas de Anexo

<b>Tabla A - 1</b> Historia del manejo de suelo y cultivos desde el año 1984 hasta el año 2008.....	148
<b>Tabla A - 2</b> Descripción de manejos durante el año 2009 .....	149
<b>Tabla A - 3</b> Descripción de manejos durante el año 2010 .....	150
<b>Tabla A - 4</b> Descripción de manejos durante el año 2011 .....	151
<b>Tabla A - 5</b> Temperaturas medias (°C) y precipitaciones mensuales (mm) en EEA INTA Bordenave. Año 2009.....	153
<b>Tabla A - 6</b> Temperaturas medias (°C) y precipitaciones mensuales (mm) en EEA INTA Bordenave. Año 2010.....	154
<b>Tabla A - 7</b> Temperaturas medias (°C) y precipitaciones mensuales (mm) en EEA INTA Bordenave. Año 2011.....	155
<b>Tabla A - 8</b> Porcentaje de humedad del suelo en las muestras correspondientes a los años 2009 y 2010. ....	156
<b>Tabla A - 9</b> Porcentaje de humedad del suelo en las muestras correspondientes al año 2011.....	156
<b>Tabla A - 10</b> Contenido de agua total del suelo (mm lámina) en las muestras tomadas en el año 2011.....	156

**Tabla A - 1** Historia del manejo de suelo y cultivos desde el año 1984 hasta el año 2008.

Período	Cultivo	Manejo
1984-1998	Trébol subterráneo – Trigo Secuencia 2 x 2	Labranza conservacionista utilizando rastra de discos de tiro excéntrico, arado de cinceles, cultivador de campo o barra escardadora.
1999	Trigo pan	Reducido período de barbecho, con utilización de rastra (generalmente dos pasadas) en LC y LV, y una aplicación de glifosato (GF) + 2,4-D en SD. La fertilización se realizó exclusivamente en el cultivo de trigo hasta el año 2008.
2000	Avena <sup>f</sup>	Se implanta luego de un barbecho desde la cosecha del trigo antecesor. Rastra de discos en LC y LV. Una aplicación de GF + 2,4-D en SD (dosis habituales: 2 L ha <sup>-1</sup> y 0,250 L ha <sup>-1</sup> respectivamente). Pastoreo directo (P): animales de aproximadamente 350 kg de peso (vaquillonas) con altas cargas instantáneas (superiores a 200 animales ha <sup>-1</sup> ). Tratamientos No Pastoreados (NoP): El corte del forraje se realiza con picadora o cosechadora experimental de forrajes, retirando la totalidad del material de las parcelas. El número de pastoreos/cortes oscila entre 1 y 2 según condiciones climáticas de cada año.
2001	Trigo pan	Igual al año 1999.
2002	Avena <sup>f</sup> – Soja	El cultivo de soja se implanta sobre el verdeo luego de un breve período de barbecho de aproximadamente 2 meses. En LC se utilizaron dos pasadas de rastra de discos; en LV una pasada de arado de cinceles y rastra de discos, y en SD una aplicación de GF + 2,4-D.
2003 - 2008	Trigo Avena <sup>f</sup> – Soja /Sorgo (2008)	Se repite el manejo de los años anteriores (1999 – 2002). A partir de 2008 se modificó el tratamiento NoP eliminándose el cultivo con herbicidas a principios de encañazón y permaneciendo con cultivo de cobertura. En el cultivo de avena de 2008 se aplicó N en dosis de 0, 15 y 30N. En 2008 se intentó reemplazar el cultivo de soja por el de sorgo, pero no se pudo lograr por distintos motivos.

<sup>f</sup> Cultivo utilizado como forraje

**Tabla A - 2** Descripción de manejos durante el año 2009.

ENERO
Sorgo sembrado en diciembre no nace por sequía. Se mantiene el suelo sin movimiento. No hay nacimiento de malezas.
FEBRERO
Sin movimientos.
MARZO
Sin movimientos.
ABRIL
Sin movimientos. <b>30 de abril: PRIMER MUESTREO 2009 (BOR1).</b>
MAYO
Sin movimientos.
JUNIO
Sin movimientos.
JULIO
<b>16 de julio:</b> Siembra de <b>trigo BIOINTA 2002</b> 95 kg ha <sup>-1</sup> . No se realizan labranzas ni aplicaciones de herbicidas porque las parcelas estaban limpias de malezas por sequía. En tratamientos con fertilización nitrogenada (30N y 60N) se aplican 15 kg N ha <sup>-1</sup> a la siembra.
AGOSTO
Sin movimientos.
SEPTIEMBRE
<b>29 de setiembre:</b> Se pulveriza con Peak Pack y 400 cm <sup>3</sup> de 2,4-D todo el cultivo.
OCTUBRE
<b>6 de octubre:</b> Se fertiliza con 15N los tratamientos 60N completando así la dosis a 30N.
NOVIEMBRE
<b>3 de noviembre: SEGUNDO MUESTREO 2009 (BOR2).</b> Se realiza corte para biomasa de <b>trigo</b> porque el cultivo se estaba perdiendo por sequía.
DICIEMBRE
Cultivo de trigo perdido por sequía.

**Tabla A - 3** Descripción de manejos durante el año 2010.

ENERO
Sin movimientos.
FEBRERO
<b>17 de febrero:</b> Rastra de discos en todos los tratamientos con labranza.
MARZO
<b>9 de marzo:</b> Siembra de <b>avena</b> . No se aplica fertilizante nitrogenado (elevado nivel de N disponible en el suelo)
ABRIL
Sin movimientos.
MAYO
El cultivo desarrolla relativamente bien.
JUNIO
<b>1 de junio: PRIMER MUESTREO 2010 (BOR3).</b> <b>2 de junio:</b> <i>Primer pastoreo de avena.</i> Se evalúa forraje en tratamientos P y NoP.
JULIO
Sin movimientos.
AGOSTO
Sin movimientos. <b>11 de agosto: SEGUNDO MUESTREO 2010 (BOR4).</b>
SEPTIEMBRE
<b>17 de septiembre:</b> el tratamiento NoP se pulveriza con glifosato (1 L) + 2,4-D (0,2 L), evaluándose la cantidad de forraje o cobertura. <b>27 de septiembre:</b> determinación de agua en el suelo, corresponde a la pulverización del cultivo de cobertura.
OCTUBRE
<i>Segundo pastoreo de avena.</i> Se evalúa forraje en tratamientos P y NoP.
NOVIEMBRE
El cultivo de sorgo correspondiente a la siembra de noviembre 2010 no se realiza por problemas de logística.
DICIEMBRE
Sin movimientos.

**Tabla A - 4** Descripción de manejos durante el año 2011.

## ENERO

**18 de enero:** Por razones ajenas al manejo del experimento no es posible sembrar el cultivo de sorgo 2010. En su reemplazo se continúa el barbecho para verdeo de invierno con rastra de discos (tratamientos bajo LC), y glifosato + 2,4D (tratamientos bajo SD).

## FEBRERO

**14 de febrero:** Cíncel superficial con reja pie de pato y escardador rotativo en todas las parcelas con LC. Los tratamientos de SD (7 a 9) se encuentran limpios de vegetación viva, excepto por manchones aislados de cardo ruso y quinoa que se limpian a mano antes de la siembra.

**23 de febrero:** Siembra de **centeno (cv. Camilo INTA), consociado con *Vicia villosa*** en todos los tratamientos. La mezcla de semillas tuvo 120 kg centeno y 30 kg vicia, con una densidad de siembra de la mezcla de 83 kg ha<sup>-1</sup>. Se aplica fertilización basal en los tratamientos 30N y 60N con Fosfato diamónico. El nivel de producto fertilizante aplicado fue de 64 kg ha<sup>-1</sup> (11 kg N ha<sup>-1</sup> y 12,8 kg P ha<sup>-1</sup>). Se reguló en forma diferencial la profundidad de siembra en LC respecto de SD. El contenido de humedad de la cama de siembra fue adecuado para la operación. El nivel planificado originalmente de 20 kg ha<sup>-1</sup> no pudo ser por las posibilidades de regulación del cajón fertilizador de la sembradora Agrometal (>40 kg/ha).

## MARZO

**15 de marzo:** Cultivo emergido en todas las parcelas excepto las de SD. No parece excesiva la profundidad de siembra, las semillas están germinando a unos 4-5cm y todavía no alcanzaron la superficie (humedad, temperatura excesiva).

**29 de marzo:** resiembra de las parcelas de SD (todas). Se determinó la causa del problema de nacimiento: faltaban algunas ruedas limitadoras de profundidad (8 cuerpos de siembra), en la sembradora Agrometal. Solucionado el inconveniente y recolocadas las ruedas el nacimiento del cultivo fue excelente (aunque un mes más tarde).

## ABRIL

**28 de abril: PRIMER MUESTREO 2011 (BOR5).**

## MAYO

**3 de mayo:** Muestreo de biomasa en las parcelas de LC. Corte con tres submuestras de 0,25 m<sup>2</sup> cada una sin diferenciar submuestras (0,75m<sup>2</sup> por unidad experimental).

**3-6 de mayo:** *Primer Pastoreo*. Mientras se iba cortando el pasto se fue pastoreando por bloque, solamente LC. 25 vacas de aproximadamente 450 kg estuvieron unos 4 días para comer los 4 bloques (sólo de LC).

**9 de mayo:** Muestreo de biomasa aérea en los tratamientos NoP de LC.

**30 de mayo:** Muestreo de biomasa aérea en los tratamientos de SD P y en el tratamiento LC-P que se había resembrado.

Continuación Tabla A-4

### JUNIO

**1 de junio:** *Pastoreo* en SD con 25 vacas de 450 kg, bloques I y II.

**2 de junio:** *Pastoreo* en SD con 25 vacas de 450 kg, bloque III.

**6 de junio:** Muestreo de biomasa aérea en tratamientos bajo SD NoP.

**8 de junio:** Picadora sobre los tratamientos NoP para emparejar su altura con los de SD NoP que se sembraron más tarde.

**14 de junio:** **SEGUNDO MUESTREO MICROBIOLOGIA 2011 (BOR6).**

### JULIO

**26 de julio:** **TERCER MUESTREO 2011 (BOR7).**

### AGOSTO

**19 de agosto:** Segundo muestreo de biomasa aérea de centeno + vicia en todos los tratamiento P y NoP.

**23-30 de agosto:** Segundo *pastoreo* con 25 vacas de 450 kg, cuidando que quede un remanente de pasto. Herbicida (Glifosato 2 L + 2,4D 0,250 L + Aditivo) en parcelas NoP, seguido de picadora para emparejar el rastrojo.

### SEPTIEMBRE

**7 de septiembre:** **CUARTO MUESTREO 2011 (BOR8).**

**12-13 de septiembre:** Inicio del barbecho para sorgo forrajero. Rastra pesada en tratamientos 1 a 3, en tratamientos P y NoP. Herbicida (Roundup + 2,4 D) en SD (P y NoP).

### OCTUBRE

**18 de octubre:** **QUINTO MUESTREO 2011 (BOR9).**

**20 de octubre:** Rastra excéntrica pesada en tratamientos bajo LC. Hay algún rebrote de verdeo en SD y dientes de león no controlados por herbicida.

**28 de octubre:** Poder germinativo de la semilla de sorgo a sembrar. Muy buena germinación (>95%).

### NOVIEMBRE

**15 de noviembre:** Cíncel superficial con escardador rotativo en LC, herbicida (Glifosato + 2,4-D) en SD.

**18 de noviembre:** **SEXTO MUESTREO 2011 (BOR10).**

**21 de noviembre:** Siembra de sorgo híbrido silero (AD-86 SA de adSur) (nace a la semana).

### DICIEMBRE

Sin actividades

Tabla A - 5 Temperaturas medias (°C) y precipitaciones mensuales (mm) en EEA INTA Bordenave. Año 2009.

Día del mes	E		F		M		A		M		J		J		A*		S		O*		N		D	
	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm
1	19,0		17,0		24,9		11,8		20,4		6,3		7,45				10,8				18,9		19,6	
2	17,8		13,4		21,6		19,6		20,3		5,2		8,1				10,3				16,4	3,5	17,5	
3	21,5		23,0		18,0	30	20,0		21,9		9,4		8,4				11,2				15,0		13,55	
4	22,8		22,9		22,1		14,5		14,3	4	12,6		10,6				10,2				17,0		16,4	
5	24,7		23,0	10,5	21,2		18,0		11,6		10,3		10,6				11,9				15,6		16,51	34
6	21,5		19,4		23,6	8	19,1		12,2		7,1		11,4				12,6	2,5			14,1		15,67	
7	21,5		18,2		21,0	9	16,0		12,3		9,0		10,0				8,2	15,5			13,2		18,3	
8	22,8		21,5		20,7		13,4		11,9		8,3		4,6				4,3				17,0		18,45	
9	24,8		21,7		20,6		15,05		17,5		7,6		7,3				6,6				14,9		20,6	
10	27,0		25,0		19,7		17,4		17,3		9,4		5,1				8,4				15,1		21,8	
11	26,6		21,1		21,6		18,0		8,9	3,5	7,0		7,6				11,6				17,2		23,6	
12	25,0	7	21,0		23,0	1,5	22,9		7,4	9,5	9,3		7,45				12,2				19,0		19,3	
13	22,0	2	25,6		24,6		16,5		7,7		9,4		5,35				15,4				21,4		19,6	
14	26,4		25,3		20,6		13,2		7,3		10,1		5,89				17,0				20,0		18,7	
15	23,7		28,0		12,6		16,9		8,2		8,9		6,8				14,8	6			23,4		22,4	
16	23,0		23,4	6	18,5		20,9		9,4		7,0		6,6				15,2				22,0		22,6	
17	21,5		24,6		15,9		20,6		11,0		10,2		7,9				9,0				19,4	23	25,3	
18	12,8		29,1		18,5		13,6		7,1		10,6		10,2				9,6	16			20,0	1	24,9	35
19	21,8		28,4		22,35		11,2		10,7		12,45		11,35				9,5				18,7		22,2	105
20	26,0		20,6	6,5	21,96		12,1		13,0		8,4		10,7	7			11,4				19,8		19,7	
21	28,2		16,5		20,3		16,3		14,5		11,0		8,9	2			9,4	7			23,9		22,2	
22	27,5		19,0		21,25	17	15,3		17,8		5,25		***	15			8,0				22,4		23,9	
23	27,8		20,7		19,6		13,2		14,5		5,0		1,5				7,8				20,1		26,5	2
24	30,0		21,9		23,6		12,0		14,6		4,25		2,2				7,6				16,6	29	21,7	17
25	21,2		23,4		24,3		15,1		12,6	2,2	4,65		2,9				12,4				19,0		21,0	
26	22,4		23,3		23,2		12,8		8,4		4,3		3,4				10,0				18,4		23,0	1,5
27	23,6		22,4		22,76		16,6		8,0		8,0		3,7				8,6	8			21,4	15	24,2	
28	23,5		22,8		23,3		17,2		7,6		8,1		4,5				10,0				22,4		22,0	
29	24,2				22,4		14,3		7,2		7,6	0,2	4,6				9,5				19,0		17,6	
30	32,8				17,8		14,2		7,2		6,2		2,9				8,6				18,0		17,5	
31	19,0				13,2				8,1				6,15										17,4	
Tot		9		23		65,5		0		19,2		0,2		24		2,5		55		8,5		71,5		194,5
Acum		9		32		97,5		97,5		116,7		116,9		140,9		143,4		198,4		206,9		278,4		472,9

\*No se registran datos diarios

**Tabla A - 6** Temperaturas medias (°C) y precipitaciones mensuales (mm) en EEA INTA Bordenave. Año 2010.

Día del mes	E*		F		M		A		M		J		J		A		S		O		N*		D		
	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	
1	26,8		26,0	0,6	21,2		15,9		19,6		7,6		8,4		1,9		7,2		8,3					21,7	
2	25,75		25,6	4,8	21,6		15,0		19,0		8,9	0,2	8,1		3,8		8,65		10,5					20,62	
3	24,65		21,8	40	18,7		9,4	0,5	15,6		9,6		10,6		3,5		6,9		14,0					17,8	
4	19,5		21,4		20,0	1,4	10,2		10,5		10,0		11,0		3,0		11,2	48	15,8					19,72	
5	19,0		21,3		17,4		10,3		16,2		10,6		8,0	0,2	2,5		10,6		17,2					19,4	
6	19,25		23,5		21,0		12,5		11,2		10,3		4,2	12,5	7,6		13,7		14,6					25,45	
7	18,8		22,4	30	25,1		17,6		9,3		9,0		7,1		10,4		16,0		12,9					21,5	
8	19,7		21,5		21,0		16,0		10,0		7,2		6,0	0,5	9,1		17,4		14,6					19,41	
9	19,5		25,0		17,3	36,5	15,4		11,2		6,0		4,1		9,0		15,6		15,6					23,4	
10	19,6		19,4		17,8		18,2		10,0		6,9		7,45		12,0		15,3	24	15,6					21,6	
11	23,0		21,6		19,8		16,0		11,1		7,4		7,0		11,3		11,6		18,0					17,5	
12	28,0		27,0		18,4		13,5	1,5	13,0		7,3		2,6		10,2		12,8		19,2					15,08	
13	27,2		20,8	12,5	22,2		10,2	0,8	13,2		6,9		3,0		5,3		11,3	1,5	19,4					18,4	
14	21,0		18,9		13,9		12,5		13,0	1	12,2	4,5	2,1		7,3		10,3		12,6	5				22,4	
15	20,8		18,0		11,2		10,0		8,5		9,0		0,5		7,0		11,95		8,4					22,5	
16	22,4		13,7	1	13,8		14,3		5,6		5,5	1	1,45		9,0		11,0		11,0					27,0	
17	17,3		17,6		18,6	3	15,8		7,3		6,0		2,0		14,6		8,9		10,9					23,8	3,4
18	20,5		21,6		18,4		15,0		9,5		6,9	10	2,1		14,1		8,9		17,6					17,0	
19	22,4		23,2	9,5	22,4		12,4		10,2		6,6	3,5	6,0	2	9,4		13,4		17,6					18,2	
20	19,6		19,2		20,0		12,5		9,6		4,5		5,3		11,6		15,6		17,8					22,4	
21	24,4		18,0		19,4		9,0		14,3		3,6		5,0		13,2		11,3		16,5					26,9	
22	24,7		17,9	11	15,6		5,0		15,3	3	10,0		4,0		12,75		13,2		12,3					25,85	
23	25,4		17,8		17,7		12,6		14,0	6,5	11,2		4,2		8,3	1,8	10,4		11,0					23,6	2
24	27,6		15,2		16,5		7,3		12,4		9,0		9,0		12,2		13,0		15,6	3				24,2	
25	26,0		17,6		20,7		10,3		9,6		8,6		6,5		15,2		13,8		15,3					23,6	
26	22,6		17,4		19,5		12,5		12,3		9,7		8,0		14,8		16,9		19,7					27,4	
27	25,1		18,4		20,6		11,4		11,7	0,2	6,4		12,2		11,2		15,3		16,8	0,9				29,7	
28	19,6		20,4		22,0		11,0		13,6		9,1		7,3		14,6		12,7	27	16,0					27,0	
29	22,0				22,4		11,3		10,0		9,2		9,4		6,5		12,35		12,6	40				24,2	2,4
30	24,0				18,7	4,5	19,6		6,3		6,7		9,1		11,0		8,0		13,7	2,5				30,2	
31	20,5				23,7	12			5,5				6,0		9,8				15,6					27,0	
Tot		40,7		109,4		57,4		2,8		10,7		19,2		15,2		1,8		100,5		51,4		57		7,8	
Acum		40,7		150,1		207,5		210,3		221		240,2		255,4		257,2		357,7		409,1		466,1		473,9	

\*No se registran datos diarios

Tabla A - 7 Temperaturas medias (°C) y precipitaciones mensuales (mm) en EEA INTA Bordenave. Año 2011.

Día del mes	E		F		M		A		M		J		J		A		S		O		N		D	
	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm	T°med	mm
1	26,8		17,8		22,39		15,6		10,3		11,7		2,8		5,5		12,5		14,8		18,0		16,8	
2	25,75		18,0		21,9		15,3		9,2		8,9		2,3		7,6		13,2		13,4		20,1		21,4	
3	24,65		21,6	8,5	25,3		15,9		10,0		4,3		4,0		4,75		12,3		10,0		18,6	18	22,3	
4	19,5	46,5	18,3		24,9		15,6		11,1		4,6		5,0		4,0		9,8		15,2		19,6	36	20,8	11
5	19,0	5	17,8		25,5		18,9		12,0		6,5		3,8		8,3		9,7		16,0		18,9		22,4	
6	19,25	36	17,2		22,6		18,5		10,1		6,9		7,0		7,0		9,2		16,0	12	22,0		23,4	
7	18,8	13,5	18,4		24,4		19,9		14,2		7,2		9,8		12,3		13,6		15,3	6,5	20,7	22	23,8	
8	19,7	19	21,7		25,2		13,0		7,6		10,8		9,7		12,4		15,3	0,8	13,2		20,3	83	22,9	
9	19,5		19,7		26,8		17,0		10,0		11,3		12,5		11,6		15,2		13,0		15,4	14	25,6	
10	19,6		20,5		25,4		18,6		13,6		11,7		11,4		15,7	1	11,3		13,5		13,6		26,1	
11	23,0		21,1		18,9	10	19,6		18,3		10,3		13,5		14,0		14,5		14,4	20	17,8		20,4	
12	28,0		21,3	15	13,4	30	17,3		11,2		9,8		10,9		13,0		14,9		12,0	43	21,0		16,5	
13	27,2		20,9		12,6		12,9	0,5	11,9	13,5	6,5		11,3		9,0		13,6		12,6	16	22,5		17,6	
14	21,0	1,7	22,0		13,0		10,6		12,45		7,4		13,5		8,0		14,3		15,4		21,3		22,8	
15	20,8	29	26,0		14,9		9,0		14,36		8,3		10,6		11,4		17,3		15,6		20,2		20,65	
16	22,4		25,5		16,6		12,7		12,9		8,9		10,4		9,5		17,4		14,3		22,0		20,15	
17	17,3		23,5	8,6	16,4		10,6	15	14,3		6,8		5,9		9,0		11,8		11,3		22,1		19,8	
18	20,5		17,5		11,3		12,6		14,7		7,0		4,5		8,3	14,5	11,0		14,3		22,2	15	24,6	
19	22,4		17,7		19,0		17,7		15,0		9,9		5,3	14	5,6		12,3		17,6		17,6		22,4	
20	19,6		20,3		23,4		15,0		11,9		7,2		6,0		3,0		15,0		17,8		18,6		26,7	
21	24,4		24,0		16,6		15,6		10,6		5,0		7,2		3,0		15,5		19,0		21,0		25,0	
22	24,7		21,6	0,4	17,9		15,2		10,3		9,5		11,0		7,0		6,30		12,3		21,0		19,6	
23	25,4		16,3	0,8	15,3		10,0		8,7		9,2	1,8	10,8		9,6		7,40		12,0		22,3		15,0	
24	27,6		18,3		14,9		13,6		7,0		5,6		12,8		9,4		13,2		13,4		22,2		21,4	
25	26,0	3,8	14,6		16,85		10,5		9,9	9	3,5		13,0		5,6		16,6		12,0		22,8		22,4	
26	22,6	10,2	22,7		12,9	19	16,1		6,45		4,7		10,0		9,0		13,8		10,0		21,9		26,8	
27	25,1	4,5	24,5		11,0		18,3		7,9		5,9		8,85		12,0		16,3		11,5		21,3	7,5	24,9	
28	19,6		20,9		15,3		9,8		11,0		5,85		7,3		9,6		19,3		16,3	0,3	21,5		25,6	
29	22,0				18,4		7,7	25,5	9,6		6,0	17	5,5		11,6		14,0		12,6		19,7		28,4	3
30	24,0	16			22,0		12,4	16	10,0		4,0		2,0		9,0		11,5		13,4		14,3		27,3	
31	20,5				18,6				11,0				2,3		8,0				16,5				26,4	
Tot		185,2		33,3		59		57		22,5		18,8		14		15,5		0,8		97,8		193,5		14
Acum		185		218,5		277,5		334,5		357		375,8		389,8		405,3		406,1		503,9		697,4		711,4

**Tabla A - 8** Porcentaje de humedad del suelo en las muestras correspondientes a los años 2009 y 2010.

Tratamiento	BOR1	BOR2	BOR3	BOR4
SD-P-0N	8,01	5,80	13,86	9,79
SD-P-30N	10,96	7,57	14,34	10,69
SD-P-60N	8,13	7,10	14,63	10,41
SD-NoP-0N	7,29	7,32	15,07	10,12
SD-NoP-30N	9,57	7,72	15,97	10,91
SD-NoP-60N	9,87	7,88	16,59	11,79
LC-P-0N	9,58	5,66	10,93	8,53
LC-P-30N	10,30	6,37	11,97	8,86
LC-P-60N	7,83	5,48	10,14	7,86
LC-NoP-0N	10,49	5,48	11,28	8,31
LC-NoP-30N	11,12	6,11	11,99	9,25
LC-NoP-60N	8,78	5,42	10,04	8,48

**Tabla A - 9** Porcentaje de humedad del suelo en las muestras correspondientes al año 2011.

Tratamiento	BOR5	BOR6	BOR7	BOR8	BOR9	BOR10
SD-P-30N- 0-5 cm	19,53	13,87	21,57	9,37	13,77	11,30
SD-NoP-30N 0-5 cm	19,17	16,03	22,00	9,70	19,77	13,70
LC-P-30N 0-5 cm	22,03	11,63	17,47	8,83	13,97	12,60
LC-NoP-30N 0-5 cm	20,50	11,83	20,97	8,90	13,97	13,97
SD-P-30N- 5-20	18,60	14,77	17,57	11,20	17,90	16,57
SD-NoP-30N 5-20 cm	19,37	14,63	17,63	12,97	19,87	18,73
LC-P-30N 5-20 cm	20,00	13,37	16,70	10,10	17,50	17,00
LC-NoP-30N 5-20 cm	19,53	14,53	18,37	12,53	18,47	18,37

**Tabla A - 10** Contenido de agua total del suelo (mm lámina) en las muestras tomadas en el año 2011.

Tratamiento	BOR5	BOR6	BOR7	BOR8	BOR9	BOR10
SD-P-30N- 0-5 cm	11,04	7,83	12,19	5,29	7,78	6,38
SD-NoP-30N 0-5 cm	10,83	9,06	12,43	5,48	11,17	7,74
LC-P-30N 0-5 cm	12,45	6,57	9,87	4,99	7,89	7,12
LC-NoP-30N 0-5 cm	11,58	6,69	11,85	5,03	7,89	7,89
SD-P-30N- 5-20	11,35	9,01	10,72	6,83	10,92	10,11
SD-NoP-30N 5-20 cm	11,81	8,93	10,76	7,91	12,12	11,43
LC-P-30N 5-20 cm	36,60	24,46	30,56	18,48	32,03	31,11
LC-NoP-30N 5-20 cm	35,75	26,60	33,61	22,94	33,79	33,61