

5 DE DICIEMBRE DE 2024

**EVALUACIÓN DE POBLACIONES DE
MICROORGANISMOS DEL CICLO DEL
NITRÓGENO EN SUELO BAJO
CULTIVO DE RAIGRÁS FERTILIZADO
CON DIGERIDOS ANAERÓBICOS
PROCEDENTES DE LA PRODUCCIÓN
DE BIOGÁS**



Meier Carlos Omar

Docente tutor:

- Dra. María Celina Zabaloy

Docentes consejeros:

- Dra. Jessica Basualdo
- Dra. Marianela Morales

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Celina Zabaloy, por su gran predisposición, por el apoyo incondicional en este último tramo final. Por darme el espacio para poder aprender y poder nutrirme de conocimientos que aún no estaban en mi alcance.

A la familia de mi tío Eduardo “Bato” Meier, Nancy, Lucre, Juane y Chule por brindarme la posibilidad de radicarme en Bahía Blanca para afrontar mis estudios universitarios.

A mi familia por el apoyo continuo durante el transcurso de mis estudios.

A mis amigos, por los años de amistad compartidos.

A Juan Ignacio Comezaña “Juani”, Sebastián Robein y Nicolas Pesce, por transformarse en grandes amistades que obtuve en mi paso por la universidad.

A la Universidad Nacional del Sur por permitirme estudiar y formarme en el ámbito personal y profesional.

Al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur y a cada uno de los profesores responsables de las materias, aprendí de todos y cada uno de ellos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	0
ÍNDICE	2
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS POR DIGESTIÓN ANAERÓBICA.....	5
1.2 FERMENTACIÓN ANAERÓBICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS.....	6
1.3 CICLO DEL NITRÓGENO	9
1.3.1 Mineralización – inmovilización	10
1.3.2 Entradas de nitrógeno	15
1.3.3 Salidas de nitrógeno	15
1.4 DINÁMICA DE LOS FERTILIZANTES NITROGENADOS	16
1.5 SUELO RIZOSFÉRICO.....	17
1.6 <i>Lolium perenne</i> (NV: RAIGRÁS PERENNE)	17
HIPÓTESIS:	19
OBJETIVOS:	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 Suelo:	19
2.2 Digerido anaeróbico:.....	20
2.3 Ensayo en invernáculo:	22
2.4 Análisis de biomasa:.....	23
2.5 Muestreo de suelo rizosférico:	23
2.6 Extracción de ADN:.....	23
2.7 Cuantificación de genes del ciclo del N:.....	23
2.8 Análisis estadísticos y diseño experimental	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA ACUMULADA	29
3.2 ABUNDANCIA DE BOA, AOA, DESNITRIFICANTES.....	31
3.3 CORRELACIONES ENTRE BACTERIAS Y BIOMASA	33
4. CONCLUSIONES	34
5. BIBLIOGRAFÍA.....	35

RESUMEN

El biogás, generado a través de la digestión anaeróbica de residuos orgánicos, representa una fuente renovable de energía con alto potencial en Argentina, dada la relevancia de su sector agroindustrial y ganadero. Actividades como la producción porcina, láctea y de biodiésel generan grandes cantidades de desechos que, mediante su tratamiento en biodigestores, no solo producen energía limpia, sino también reducen emisiones de metano y patógenos. Además, el subproducto del proceso, conocido como digerido, actúa como un biofertilizante rico en nutrientes, promoviendo prácticas agropecuarias sostenibles al cerrar el ciclo de nutrientes. Sin embargo, su manejo adecuado es fundamental para prevenir impactos ambientales y maximizar su interacción beneficiosa con los microorganismos del suelo, un área de investigación aún poco explorada en sistemas suelo-planta-microbioma.

El estudio consistió en un ensayo en invernáculo donde se evaluó la producción de biomasa de raigrás (*Lolium perenne* L.) y las comunidades microbianas asociadas al ciclo del nitrógeno en suelo tratado con diferentes fertilizantes: digerido anaeróbico, urea, combinado y control sin fertilización. Se utilizó un suelo agrícola de la región para la preparación de las macetas, mientras que el digerido anaeróbico provino de un biodigestor destinado a la producción de biogás a partir de estiércoles de sistemas de producción intensiva. Las macetas fueron fertilizadas con una dosis equivalente a 106 mg N-NH₄⁺ por kilogramo de suelo seco, según el tipo de fertilizante. Al finalizar el ensayo, a los 42 días posteriores a la siembra, se analizó la biomasa aérea acumulada y se recolectó suelo rizosférico para la extracción de ADN microbiano. Posteriormente, se cuantificaron genes microbianos relacionados con el ciclo del nitrógeno (*amoA* de bacterias y arqueas, *nirK* y *nirS*) mediante PCR en tiempo real.

Los resultados mostraron que los tratamientos con digerido y fertilización combinada aumentaron significativamente la biomasa acumulada en comparación con el control y la urea, alcanzando valores similares entre ellos. La abundancia del gen *amoA* de bacterias oxidantes de amoníaco fue mayor con fertilización combinada y se correlacionó positivamente con la biomasa acumulada ($r = 0,65$). En contraste, la abundancia de arqueas oxidantes se correlacionó negativamente con la biomasa ($r = -0,61$). No se observaron efectos significativos en los genes *nirK* y *nirS*.

En conclusión, el digerido anaeróbico demostró ser una alternativa eficiente y comparable a la urea, con el beneficio adicional de incorporar materia orgánica y nutrientes que activan la microbiota del suelo y favorecen el ciclo de nutrientes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS POR DIGESTIÓN ANAERÓBICA

El biogás es una fuente de energía renovable producida mediante la descomposición anaeróbica de materia orgánica, como residuos agroindustriales, estiércol, residuos sólidos urbanos y efluentes industriales. En Argentina, la producción de biogás ha tomado relevancia en las últimas dos décadas, impulsada por la necesidad de diversificar la matriz energética y reducir la dependencia de los combustibles fósiles.

El potencial del país para producir biogás es alto, especialmente considerando su gran actividad agroindustrial y su industria ganadera. Sectores como la producción porcina, láctea y de biodiesel generan grandes volúmenes de residuos orgánicos que pueden ser utilizados para producir biogás, lo que convierte a Argentina en un escenario favorable para este tipo de energía (Tobares, 2012).

En Argentina, la producción ganadera intensiva es una de las actividades más importantes para la economía. En estas explotaciones, grandes cantidades de estiércoles y efluentes se disponen en los suelos adyacentes causando sobrecarga de nutrientes y diseminación de patógenos en el agroecosistema. La aplicación excesiva de esos residuos produce pérdidas de nitrógeno (N) por lavado de nitratos, emisiones de amonio y óxido nitroso a la atmósfera (Kumar *et al.*, 2013). A nivel mundial, los establecimientos de explotación intensiva emplean la digestión anaeróbica para el tratamiento de los estiércoles, produciendo energía en forma de biogás, con el beneficio añadido de reducir los residuos orgánicos, los malos olores y la carga de patógenos (Gerardi, M. 2003).

Estos desechos, en lugar de ser una carga, tienen un gran potencial para ser aprovechados en la producción de biogás a través de digestores anaeróbicos, lo que permite obtener energía renovable y reducir emisiones de gases de efecto invernadero, especialmente metano. Además, el subproducto de este proceso, conocido como digerido anaeróbico (DA), puede ser utilizado como fertilizante orgánico de alta calidad, cerrando el ciclo de los nutrientes en las actividades agropecuarias y contribuyendo a una agricultura más sostenible.

El DA contiene cantidades considerables de materia orgánica y nutrientes (N, P y K), siendo una opción atractiva como biofertilizante (Alburquerque *et al.*, 2012). Nyberg *et al.*, (2006) reportaron que, dependiendo de la dosis, el uso de DA de residuos domiciliarios contiene sustancias inhibitorias para la actividad de las bacterias oxidantes de amoníaco (BOA) en suelos agrícolas. Sin embargo, hay escasa información sobre el efecto de DA de estiércoles sobre los microorganismos del ciclo del N en sistemas suelo-planta-microbioma.

1.2 FERMENTACIÓN ANAERÓBICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS

Un biodigestor es un sistema que convierte material orgánico en biogás y un residuo sólido o líquido, conocido como digerido, que puede utilizarse como fertilizante. Los materiales que ingresan a un biodigestor se eligen en función de su capacidad para descomponerse anaeróbicamente y producir biogás, así como de los nutrientes que aportan al digerido (Figura 1).

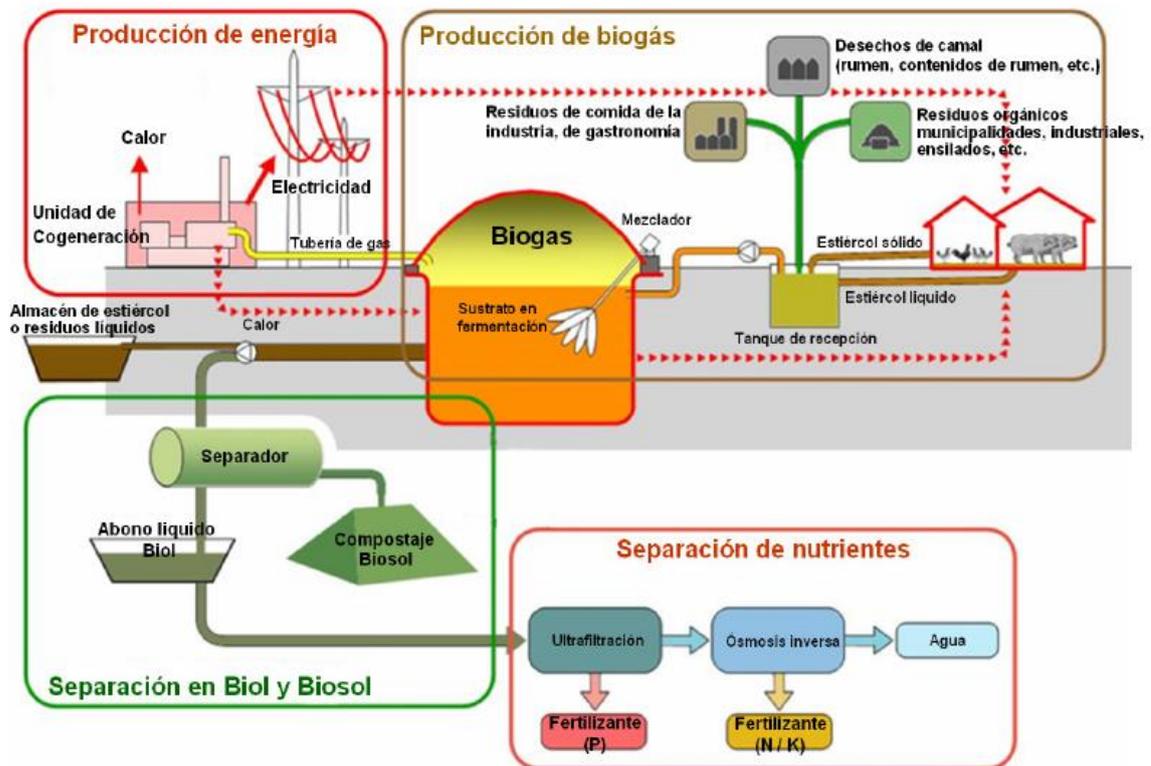


Figura 1. Diagrama del proceso de producción de biogás (Aparcana Robles, 2008).

El biogás es una mezcla de gases combustibles utilizados en diferentes aplicaciones como fuente de energía. La mezcla de estos está compuesta fundamentalmente de metano (50-70% CH₄), dióxido de carbono (CO₂), ácido sulfhídrico (<2% SH₂) y otros gases (NH₃, N₂, H₂). El metano es el principal gas combustible y la mezcla de gases tiene una potencia calorífica en torno a los 5500 Kcal/m³ (Palau *et al.*, 2016).

Las posibilidades de elección de materiales a introducir en el biodigestor son variadas. Sin embargo, si tuviéramos que agruparlos en categorías representativas hablaríamos de los estiércoles animales y los restos vegetales.

Los estiércoles (de ganado vacuno, porcino, ovino, avícola, etc.) son ricos en nitrógeno y otros nutrientes esenciales como fósforo y potasio. Además, tienen una proporción adecuada de materia orgánica que facilita la producción de biogás. Durante la digestión anaerobia, los patógenos presentes en el estiércol se reducen significativamente, alrededor del 85% de los patógenos no sobreviven al proceso, lo que convierte al digerido resultante en un fertilizante seguro y de alta calidad (García Páez, 2013).

Los residuos agrícolas como paja, hojas, restos de cosecha y hierba, contienen carbono, un componente esencial que ayuda a equilibrar la relación carbono-nitrógeno (C/N) dentro del biodigestor. Esto es fundamental para una digestión anaerobia eficiente y para evitar la acidificación del sistema.

La mezcla de estiércol y restos vegetales es ideal porque optimiza la relación C/N, necesaria para una digestión equilibrada. El estiércol, rico en nitrógeno, se complementa con los restos vegetales, ricos en carbono. Una proporción adecuada de estos materiales maximiza la producción de biogás y mejora la calidad del digerido, ya que los nutrientes del estiércol se combinan con la fibra y materia orgánica de los restos vegetales, creando un fertilizante orgánico balanceado. Este fertilizante mejora la estructura del suelo, su capacidad de retención de agua y proporciona nutrientes esenciales para el crecimiento de cultivos (Warnars y Oopenorth, 2014). De este modo, los biodigestores no solo generan energía limpia, sino que también producen fertilizantes que promueven la sostenibilidad agrícola.

La digestión anaerobia es un proceso en el que la materia orgánica es degradada o fermentada por la acción de microorganismos en ausencia de oxígeno, originando una mezcla de metano y dióxido de carbono (biogás). El subproducto que se obtiene del proceso es una suspensión acuosa de materiales sólidos no degradados junto con nitrógeno, fósforo y otros elementos minerales inicialmente presentes en la biomasa

(fango). Este proceso engloba diferentes etapas en las que intervienen diversas poblaciones microbianas (Figura 2).

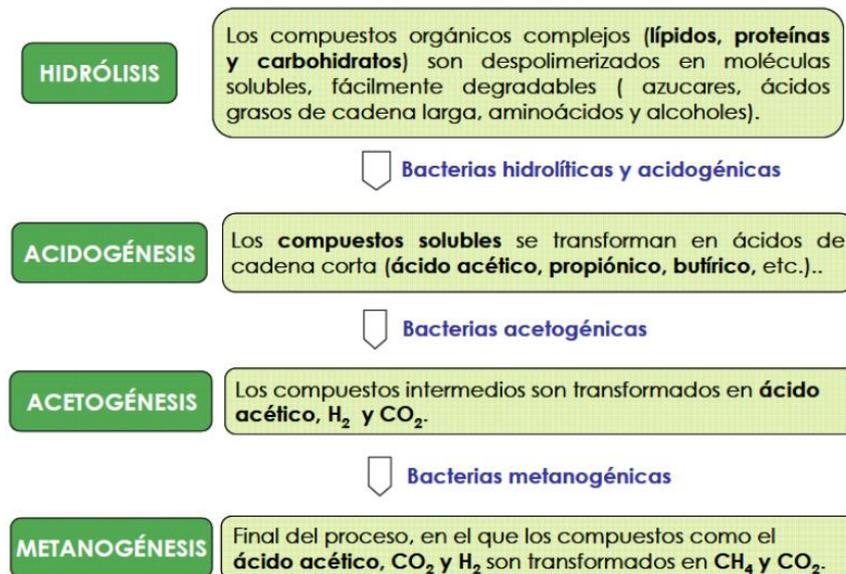


Figura 2. Fases y bacterias involucradas en el proceso de digestión anaerobia (Palau *et al.*, 2016).

La DA consta de cuatro fases (Figura 2). La primera es la “hidrólisis” donde los compuestos orgánicos complejos (lípidos, proteínas y carbohidratos) son degradados a compuestos simples como monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos. Los microorganismos responsables del proceso son bacterias hidrolíticas, las cuales producen enzimas (amilasas, proteasas y lipasas), que realizan el proceso de degradación. La tasa de hidrólisis depende de la temperatura del proceso, del tamaño de las partículas, producción de enzimas, concentración de amonio (NH₄⁺) y pH. Los materiales lignocelulósicos compuestos por celulosa, hemicelulosa y lignina poseen una velocidad de degradación muy lenta (García Páez, 2013). La degradación de lignina es limitada debido a que involucra múltiples reacciones bioquímicas que requieren de enzimas específicas encargadas de su descomposición, afectando también a la biodegradación de la celulosa y hemicelulosa. La siguiente etapa se denomina “acidogénesis”. Mediante la acción de bacterias acidogénicas obligadas reductoras de protones de hidrógeno y de bacterias homoacetogénicas, se produce la transformación de compuestos generados en la etapa anterior dando como resultado ácido acético, fórmico, butírico y pentanóico, alcoholes, aldehídos, hidrógeno, sulfuro de hidrógeno, dióxido de carbono y amoníaco.

Continúa el proceso por la fase de “acetogénesis”. En esta fase las bacterias acetogénicas transforman los compuestos generados en la etapa anterior en acetato e H_2 . El 70% del CH_4 es generado a partir de la reducción del acetato, por lo tanto, esta fase define la eficiencia de la producción de biogás. La última fase es la “metanogénesis”. En esta fase por medio de arqueas metanogénicas ocurre la transformación de las sustancias de la fase anterior en metano y dióxido de carbono. En el proceso participan arqueas hidrogenotróficas las cuales mantienen el equilibrio del hidrógeno en el medio.

Como resultado de la fermentación de los residuos se obtiene el DA, que presenta muy alta calidad agronómica y también aporta beneficios. El DA como fertilizante tiene varias ventajas, como: mejora el intercambio catiónico del suelo aumentando la disponibilidad de nutrientes; ayuda a mantener la humedad y crea un microclima adecuado para las plantas; puede emplearse como fertilizante líquido, puede aplicarse junto con agua de riego en sistemas automáticos de irrigación; estimula el desarrollo de las plantas, favoreciendo procesos como el enraizamiento (aumenta y fortalece la base radicular), acción sobre el follaje (amplía la base foliar), mejora la floración y activa el vigor y poder germinativo de las semillas, traducándose todo eso en un aumento significativo de las cosechas. Gracias a estos beneficios, el uso de DA puede reducir la necesidad de fertilizantes minerales u otro insumo.

Cabe mencionar también que la calidad del DA resultante depende de las materias primas utilizadas para el proceso, pudiendo también generar procesos no deseados como contaminaciones químicas y biológicas (Nkoa, 2013).

Dependiendo de las características de los residuos a fermentar, se estima, que, en promedio, el DA saliente del biodigestor representa aproximadamente entre el 85-90% de la materia entrante. De esto, aproximadamente el 90% es líquido (“bio”), aunque estos porcentajes pueden variar según los residuos a fermentar y del método de separación empleado.

1.3 CICLO DEL NITRÓGENO

El nitrógeno constituye uno de los elementos fundamentales para el desarrollo vegetal, se presenta frecuentemente como limitante del crecimiento vegetal, ya que es removido en cantidades superiores comparado al resto de los nutrientes, y además su nivel en los suelos es generalmente bajo. El nitrógeno se utiliza en la síntesis de proteínas, ácidos

nucleicos, aminoazúcares y otras moléculas de importancia en la célula. Este elemento favorece el crecimiento vegetativo, el tamaño de los granos y su porcentaje de proteínas.

La importancia de este elemento se destaca favorablemente en la agricultura (incrementando rendimientos y calidad de los vegetales) y desfavorablemente en el ambiente. Son conocidos ya los problemas ambientales asociados a excesos de compuestos nitrogenados. Las principales fuentes de contaminación de aguas y suelos provienen de la atmósfera y de las prácticas agrícolas donde la industria vierte aguas con elevada concentración de óxidos de N o amoníaco que contaminan los cursos de agua. Esto daría como resultado un exceso en la concentración de sales (incluidas las nitrogenadas) y podría causar la eutrofización de los mismos (Frioni, 2011).

En la capa arable, las concentraciones de N pueden variar entre 0,02% a 0,4% y superar el 2% en suelos muy orgánicos. En suelos minerales, de clima templado con 2%-3% de materia orgánica en el horizonte 0-20 cm pueden encontrarse 0,12-0,15% de nitrógeno, lo que equivale a 2000-3000 Kg N/ha. Sin embargo, la mayor parte del nitrógeno no puede ser asimilado directamente por los vegetales, solo una pequeña fracción del N orgánico (1-3%) se mineraliza por año.

La mayor proporción del nitrógeno del suelo es orgánico (98% del total) y menos del 2% son formas minerales como N_2 (nitrógeno molecular), N_2O (óxido nitroso), NO (óxido nítrico), NH_4^+ (amonio), NO_2^- (nitritos) y NO_3^- (nitratos), muchas de ellas son responsables de la nutrición vegetal, lo que las hace importantes, ya que actúan como nutrientes esenciales, intermediarios metabólicos, donadores o aceptores de electrones, y productos finales de diversas transformaciones biológicas y químicas.

Procesos como la mineralización y la inmovilización convierten el nitrógeno orgánico en formas inorgánicas que las plantas pueden asimilar, mientras que la fijación, oxidación y reducción facilitan su integración y movimiento a lo largo del ciclo. En la representación del ciclo del nitrógeno (Figura 3), se evidencia cómo estas transformaciones contribuyen a mantener la disponibilidad de nitrógeno en el ecosistema, destacando su rol en la fertilidad del suelo y en el equilibrio ambiental.

1.3.1 Mineralización – inmovilización

Las formas inorgánicas minerales amonio, nitrito y nitrato se producen continuamente en el suelo por procesos de mineralización. Amonio y nitrato son fuente de nutrientes para los vegetales mientras que los nitritos resultan tóxicos. La mayor parte es soluble en agua y son desplazados con esta hacia horizontes no alcanzados por las raíces. La fracción más retenida es el amonio que puede estar adsorbido en forma intercambiable

en el complejo arcilla-humus o fijado dentro de las láminas/capas de las arcillas. La mineralización del nitrógeno orgánico comprende dos etapas:

Amonificación: liberación de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ a partir de moléculas orgánicas. Este proceso es llevado a cabo por numerosas especies de bacterias, hongos, protozoos y algas que poseen diversas enzimas tanto intra como extracelulares.

El proceso se realiza en amplias condiciones ambientales, con innumerables sustratos (cualquier molécula orgánica nitrogenada) y la microbiota responsable incluye prácticamente a todos los microorganismos heterótrofos. La actividad es máxima en aerobiosis, temperaturas en el rango termófilo (Frioni, 2011) y humedades medias.

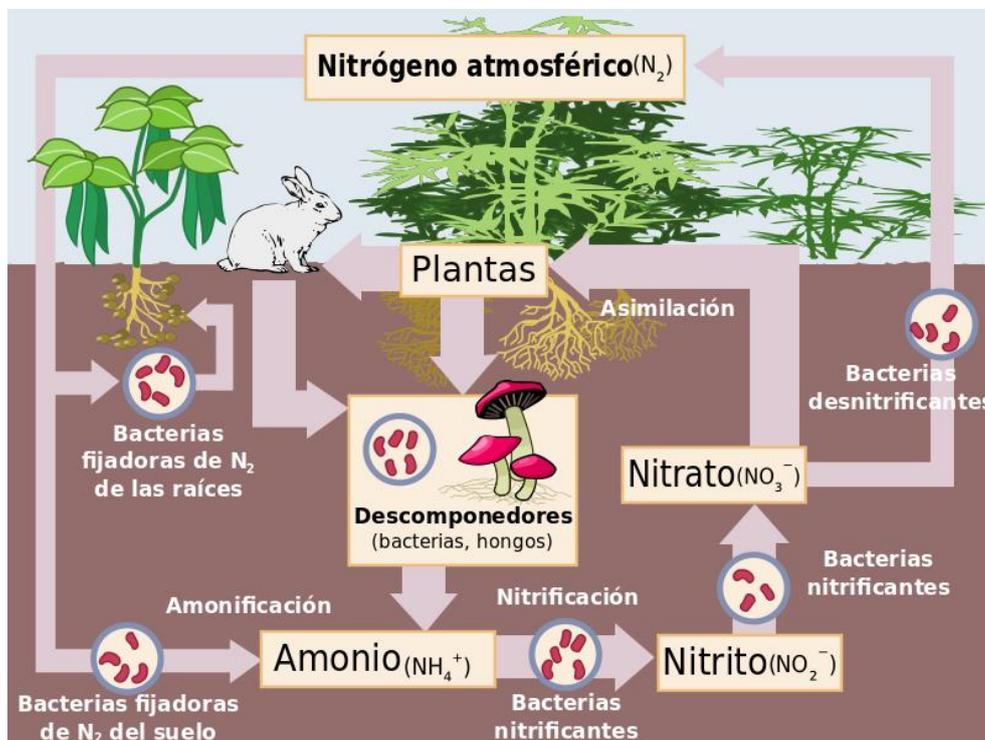


Figura 3. Ciclo del nitrógeno. Wikipedia.

Nitrificación: Se define como la conversión biológica del nitrógeno desde un estado reducido ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ - N-orgánico) a otro más oxidado (NO_3^- , NO_2^-).

La nitrificación es un proceso aeróbico de dos pasos mediados por procesos biológicos y llevado a cabo por un grupo distinto de bacterias. El primer paso se centra en la oxidación del $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$ y, posteriormente, los nitritos se oxidan a nitratos. Los

microorganismos responsables del primer paso se conocen como microorganismos oxidantes de amoníaco mientras que los que se encargan de la segunda etapa son las bacterias oxidantes del nitrito (Ochoa *et al.*, 2015).

El primer paso desempeña un papel crítico en el ciclo del nitrógeno y es el limitante en la velocidad de reacción. Aunque, hasta el 2004 se atribuía la oxidación del amoníaco exclusivamente a las bacterias, estudios moleculares posteriores demostraron la prevalencia de arqueas oxidantes de amoníaco (AOA) en sistemas naturales y en la actualidad se considera que los organismos oxidantes de amoníaco incluyen tanto AOA como BOA y son esenciales en los procesos de nitrificación (Tabla 1). BOA son a menudo considerados como los principales contribuyentes a la oxidación de amoníaco en el suelo, aunque frecuentemente se cuantifican más copias de genes de AOA que de BOA en diferentes ambientes. Las arqueas nitrificantes suelen superar en gran número a sus equivalentes bacterianas en los sistemas marinos y terrestres, es probable que controlen la oxidación del NH_3 o NH_4^+ en la naturaleza.

Las BOA poseen la subunidad alfa de la enzima amoníaco monooxigenasa, que es la enzima clave de las bacterias nitrificantes y es exclusivamente de los miembros de la beta proteobacterias y gamma-proteobacterias. Tanto AOA como BOA tienen el mismo gen funcional *amoA* que codifica la subunidad alfa de la enzima amonio monooxigenasa, la cual cataliza el primer paso en la oxidación del amoníaco (Galván y Ríos, 2013).

Tabla 1. Detalle de proceso y organismos responsables. (Madigan et al., 2015)

Procesos	Organismos
Nitrificación ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$)	
$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosopumilus</i> (Archaea)
$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	<i>Nitrobacter</i>

Este proceso es sensible a las condiciones ambientales, puede no ocurrir o ser extremadamente lento en suelos anegados, pH ácido por debajo de 6 o bajo temperaturas muy altas, dado que el rango óptimo se encuentra entre los 28° y 36° C. En general, en la región templada, la producción de nitratos es más activa en primavera y otoño, más lenta en verano e invierno.

El oxígeno es un requerimiento crítico, ya que los microorganismos oxidantes de amoníaco y el nitrito son aerobios estrictos. La estructura del suelo tiene un gran efecto: la nitrificación es inversamente proporcional al tamaño de los agregados. La atmósfera

en la vecindad de las raíces es más pobre en O₂ y más abundante en CO₂ que la atmósfera sobre el suelo, debido a la actividad respiratoria de la mayoría de los microorganismos. Por lo tanto, la nitrificación será menor en esa zona.

La humedad también es un factor limitante, dado que la misma regula el nivel de oxígeno en el suelo. La formación de nitratos cesa cuando el nivel de humedad es inferior al punto de marchitez permanente pese a que la amonificación puede permanecer aun activa. Resumiendo, la nitrificación es rápida en suelos húmedos, aireados, bien drenados, de buena estructura mientras que es más lenta en suelos pesados.

La inmovilización es el proceso simultáneo e inverso a la mineralización, por el cual las formas minerales (NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻) entran a formar parte de combinaciones orgánicas en el citoplasma microbiano.

Dicho de otro modo, el nitrógeno mineral es asimilado por los microorganismos y pasa a formar parte de combinaciones orgánicas en las células. Como deja de estar un tiempo disponible para los vegetales, se dice que ha sido inmovilizado. Este bloqueo del N mineral es transitorio, ya que las moléculas orgánicas son liberadas al ecosistema por procesos de excreción o tras la muerte celular, donde son rápidamente mineralizadas. Este proceso también se denomina ciclo interno del nitrógeno, ya que ocurre en el interior de los microorganismos.

Desnitrificación: proceso metabólico realizado principalmente por gran diversidad de microorganismos heterótrofos, que lleva a la reducción de nitratos o nitritos convirtiéndolos en óxido de nitrógeno y nitrógeno molecular como productos finales de la reacción (Frioni, 2011). Esta respiración anaerobia tiene al nitrato como aceptor final de electrones y arroja un producto final gaseoso (N₂, N₂O) a la atmósfera. Algunos ejemplos de microorganismos involucrados en este proceso incluyen *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Azospirillum* y *Alcaligenes*.

La enzima que cataliza la primera etapa de la reducción desasimiladora de nitrato es la *nitrato-reductasa*, una enzima asociada a la membrana de los microorganismos que contiene molibdeno y cuya síntesis esta inhibida por el oxígeno. Esta enzima es codificada por el gen *narG*. Las enzimas posteriores en la ruta están reguladas de manera coordinada, de modo que también son inhibidas por el oxígeno. Para que estas enzimas se expresen, además de las condiciones anóxicas, es necesaria la presencia de nitrato en el medio (Madigan *et al.*, 2015).

Luego de la primera reducción actúa la enzima *nitrito reductasa* (codificada por los genes *nirK* o *nirS*) reduciéndolo a óxido nítrico (NO) para luego transformarlo en óxido nitroso (N₂O) (Figura 4), finalmente se reduce a N₂ gaseoso por acción de la enzima óxido nitroso reductasa. Algunos organismos pueden reducir nitrito a amoníaco (NH₃) en un proceso desasimilador, pero lo más importante es la producción de productos gaseosos, especialmente el óxido nitroso (N₂O) y el óxido nítrico (NO) que causan un fuerte impacto ambiental. Cuando la reducción es incompleta por parte de microorganismos que no poseen la vía enzimática completa, los productos gaseosos liberados son primariamente NO y N₂O ocasionando un impacto ambiental por ser gases de fuerte efecto invernadero (Madigan *et al.*, 2015).

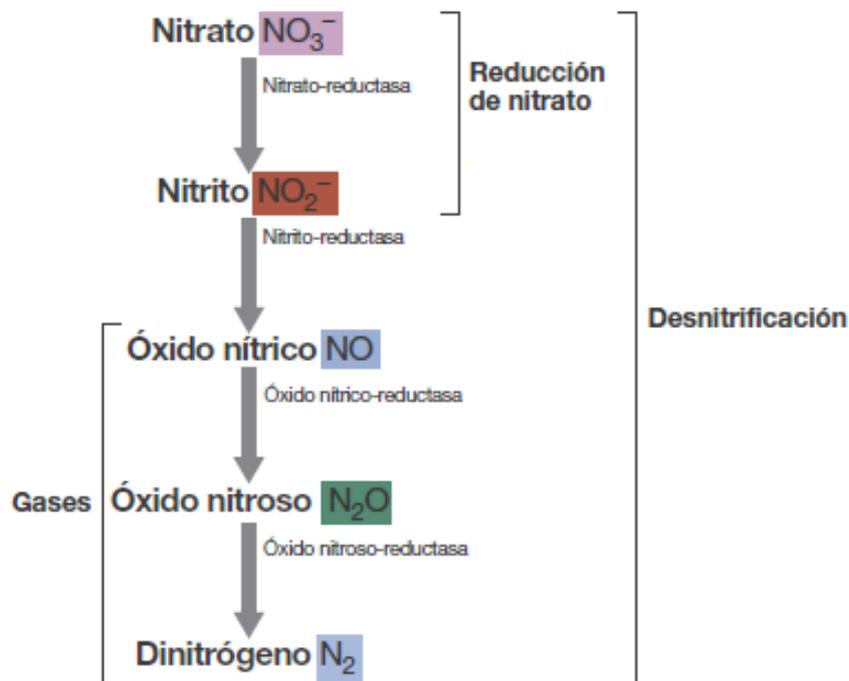


Figura 4. Etapas de la reducción desasimiladora de nitrato y enzimas implicadas en el proceso (Madigan *et al.*, 2015).

La magnitud del proceso está marcadamente afectada por las condiciones ambientales. Las condiciones que estimulan la desnitrificación son las siguientes:

- Alto nivel de nitratos (se pueden obtener a partir de nitrificación, fertilizantes u arrastrados desde otros horizontes)
- Sustancias donadoras de electrones (materia orgánica)

- Anaerobiosis (se logra fácilmente en aguas, a unos pocos centímetros de la superficie y en los micro agregados, donde la demanda biológica por parte de los microorganismos es alta y agota rápidamente el O₂, creando ambientes anaerobios).

Este proceso resulta perjudicial desde un punto de vista agronómico, ya que elimina nitrato del suelo que muchas veces se aporta con fertilizantes. No obstante, desde una perspectiva medioambiental resulta beneficioso porque elimina el nitrógeno fijado en aguas residuales que favorecerían el crecimiento de algas en ríos y lagos.

El suelo está constituido por un mosaico de hábitats, coexistiendo los oxigenados para la oxidación del amonio y los anaerobios, donde se reducen los nitratos (Frioni *et al.*, 2011).

1.3.2 Entradas de nitrógeno

- De naturaleza biológica: Constituye la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), realizada por bacterias dotadas de un complejo grupo enzimático (la nitrogenasa) capaz de reducir los triples enlaces de la molécula de N₂ a NH₄⁺, que luego es utilizado para formar aminoácidos que constituyen las proteínas. Este proceso puede ser llevado a cabo por bacterias de fijación libre y también simbióticas.
- De naturaleza no biológica: Las aguas de lluvia aportan nitrógeno combinado como amonio, nitrito, sustancias albuminoides, que provienen de suelo o aguas, de la contaminación en zonas industriales o de la fijación no biológica por radiaciones o reacciones fotoquímicas.

El hombre ha logrado la reducción de N₂ por medio de una reacción química conocida como Proceso Haber-Bosch que demanda alto consumo de energía.

1.3.3 Salidas de nitrógeno

- La desnitrificación, que fue tratada en el ítem anterior.
- La volatilización de NH₃ puede ocurrir a partir de agregados de abonos a base de urea, amonio anhidro o sales amoniacaes, pero también luego de la incorporación de restos vegetales. Las pérdidas son importantes en las siguientes situaciones: pH superior a 8, temperatura elevada y desecación, aplicación de fertilizantes en la superficie del suelo, suelos con baja capacidad de intercambio catiónico (CIC).
- Lavado es el fenómeno que ocurre con los compuestos como amonio, nitritos y nitratos que son solubles en agua y pueden ser arrastrados a horizontes fuera del contacto con las raíces.

- Tanto la erosión eólica como hídrica producen pérdidas de nitrógeno; esta última en situaciones de anegamiento tiene como consecuencia el lavado de los compuestos (Frioni, 2011).

1.4 DINÁMICA DE LOS FERTILIZANTES NITROGENADOS

Los fertilizantes nitrogenados, como la urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), se destacan en la agricultura debido a su alta concentración de nitrógeno (46%) y su costo accesible. La urea, aunque es una fuente de nitrógeno en forma orgánica, debe transformarse en amoníaco (NH_3) y luego en amonio (NH_4^+) para que las plantas puedan absorberlo, mediante un proceso de hidrolización catalizado por la enzima ureasa, presente en el suelo. Este proceso depende de la humedad y la temperatura, incrementándose su velocidad en condiciones cálidas y húmedas (Grant *et al.*, 2004).

Durante la hidrolización, la urea se descompone en amoníaco y dióxido de carbono (CO_2). El amoníaco se disuelve rápidamente en agua y forma el ion amonio, que es fácilmente absorbido por las raíces de las plantas. Sin embargo, en suelos de pH elevado o en condiciones de baja humedad, una fracción del amoníaco puede volatilizarse y perderse en la atmósfera, reduciendo así la eficiencia del fertilizante (Snyder & Bruulsema, 2007). Una vez en forma de amonio, este puede ser convertido a nitrato (NO_3^-) mediante la acción de las bacterias nitrificantes como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. El nitrato resultante también es absorbido por las plantas, aunque tiene mayor susceptibilidad a perderse por lixiviación en suelos arenosos o en condiciones de lluvias intensas (Keller & Brenner, 2018).

El uso de urea permite un manejo eficiente del nitrógeno en los cultivos, ya que puede aplicarse en sistemas de riego variados y es de fácil dosificación. Sin embargo, en condiciones de riego excesivo o en suelos de baja capacidad de retención, el nitrato resultante de la nitrificación puede lixiviarse a capas más profundas del suelo, generando pérdidas y posible contaminación de las aguas subterráneas (Grant *et al.*, 2004; Keller & Brenner, 2018). La efectividad de la urea como fertilizante se basa en maximizar la absorción de nitrógeno y minimizar sus pérdidas, un objetivo que depende en gran medida de las condiciones del suelo y del manejo adecuado de la fertilización.

1.5 SUELO RIZOSFÉRICO

La rizósfera es el entorno cercano a las raíces de las plantas donde ocurre una intensa interacción entre las raíces, los microorganismos y el suelo. Se caracteriza por ser un ambiente biológicamente activo debido a la liberación de exudados de las raíces, que son compuestos orgánicos como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y otras moléculas. Estos exudados estimulan el crecimiento de microorganismos en la rizósfera, creando un ambiente microbiano denso y diversificado en comparación con el suelo no rizosférico (Mendes *et al.*, 2015).

El suelo rizosférico es una mezcla compleja de partículas minerales, materia orgánica, agua y gases, donde las raíces de las plantas liberan exudados que promueven la actividad microbiana, creando un entorno rico en nutrientes y biológicamente activo (Hinsinger *et al.*, 2009).

En la rizósfera, las raíces de las plantas liberan exudados que fomentan una alta densidad de microorganismos, como bacterias, hongos y protozoos, que participan en procesos clave como la fijación de nitrógeno, la descomposición de materia orgánica y la mineralización de nutrientes (Frioni, 2011).

En cuanto al intercambio de gases, en el suelo rizosférico es limitado y ocurre en los poros del suelo. Las raíces y los microorganismos consumen oxígeno (O₂) y liberan dióxido de carbono (CO₂) y otros gases como el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O) durante la respiración y los procesos metabólicos. Las condiciones anaeróbicas pueden surgir fácilmente si el suelo está saturado de agua (Hinsinger *et al.*, 2009).

El suelo rizosférico, es un entorno único en términos de biología y química, siendo crucial para la fertilidad del suelo y el crecimiento vegetal. Comprender la dinámica de las comunidades microbianas involucradas en la oxidación del amonio y la desnitrificación en la rizósfera de cultivos fertilizados proporciona información valiosa para predecir el riesgo de acumulación o pérdida de nitratos y la emisión de óxido nitroso.

1.6 *Lolium perenne* (NV: RAIGRÁS PERENNE)

El *Lolium perenne* es una especie nativa de la cuenca del mediterráneo, que fue introducida en el país entre 1890 y 1900 en mezclas para césped. Luego, en 1960 fue

introducida por INTA desde Nueva Zelanda teniendo como destino distintas estaciones experimentales.

Es una de las gramíneas forrajeras más difundidas y utilizadas en los sistemas de producción animal de climas templado-húmedos. En nuestro país, su principal área de cultivo es el centro y sudeste de la provincia de Buenos Aires, pero también es factible su cultivo en valles y mallines de la Patagonia. También, es de las forrajeras más utilizadas en la región de la pampa húmeda, ya que presenta una alta calidad forrajera promedio.

Es una especie perenne de crecimiento otoño-invierno-primaveral con un marcado pico de producción de forraje en primavera (septiembre-noviembre). Su sistema radicular es superficial, denso y muy eficiente en la captación de agua. Vegeta activamente durante los meses de otoño e invierno y su diferenciación apical ocurre a fines de agosto. Acepta defoliaciones frecuentes e intensas, ya que durante gran parte del año los meristemas y sus zonas de almacenamiento se encuentran fuera del alcance de los animales. Aun después de pastoreos intensos conserva suficiente área foliar remanente para rebrotar adecuadamente.

En veranos húmedos y frescos puede producir una interesante cantidad de biomasa, aunque por lo general disminuye marcadamente su ritmo de crecimiento y no presenta latencia estival. Esta estación del año es crítica para su manejo y pone en riesgo su persistencia. De ser necesario el pastoreo este debe ser breve y no intenso, evitando que la temperatura del suelo se eleve y pierda humedad. Por ende, se aconseja que la altura del remanente sea entre 10-12 cm.

Exige más de 750 mm anuales bien distribuidos durante el año y la temperatura óptima para su crecimiento se encuentra entre los 15 y 20°C, sufre las temperaturas extremas. En condiciones favorables de nutrición mineral, estado hídrico y un buen manejo del pastoreo, puede persistir por 10 años o más.

Para expresar su máximo potencial de producción forrajera esta especie es exigente en cuanto a fertilidad de suelo. Su umbral de adaptación de suelos va desde los franco y franco-arcillosos con un pH cercano a la neutralidad. No tolera la salinidad ni alcalinidad, tampoco resiste inundaciones o sequías prolongadas.

El *Lolium perenne* es una planta que demanda altos niveles de nitrógeno (N) para su óptimo desarrollo y producción de biomasa. Generalmente, se recomienda la aplicación

de entre 100 y 300 kg de nitrógeno por hectárea y por año, dependiendo de la intensidad de manejo y las condiciones del suelo.

La aplicación de fertilizantes nitrogenados puede realizarse en fracciones, especialmente antes del inicio del crecimiento vegetativo en primavera y a lo largo del ciclo de crecimiento activo. Es recomendable complementar la fertilización nitrogenada con otros nutrientes, como fósforo (P) y potasio (K), para evitar desbalances nutricionales en el suelo (Castaño, 2005).

HIPÓTESIS:

El DA de estiércol puede utilizarse solo o combinado con urea para producir biomasa forrajera. El DA, en comparación con la urea, tendrá un efecto mayor sobre los microorganismos responsables del ciclo del N (bacterias y arqueas oxidantes de amoníaco y desnitrificantes), por su alta disponibilidad de NH_4^+ y materia orgánica.

OBJETIVOS:

Los objetivos de este Trabajo de intensificación fueron:

1. Medir la producción de biomasa aérea de raigrás luego de la aplicación de los tratamientos.
2. Cuantificar la abundancia de las poblaciones de BOA, AOA y bacterias desnitrificantes en suelo rizosférico, luego de la aplicación de los fertilizantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se analizaron muestras de ADN de suelo rizosférico y se evaluó la producción de biomasa aérea en un ensayo en macetas con raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) en invernáculo, a cargo del Dr. Marco Allegrini del Laboratorio de Ecología Microbiana en Agroecosistemas. Brevemente, se describen las condiciones y características que tuvo dicho ensayo para contextualizar el trabajo de intensificación.

2.1 Suelo:

El suelo utilizado para el ensayo fue recolectado como una muestra compuesta (0–20 cm) de una parcela agrícola ubicada en el Campo Experimental Napostá, convenio Universidad Nacional del Sur y Ministerio de Desarrollo Agrario Pcia. de Buenos Aires (MDA-PBA) (38° 25' 39" S, 62° 17' 41" O), Argentina (Figura 5). El suelo se clasifica como Paleustol Petrocálcico según la "Base de Referencia Mundial para Recursos Suelo

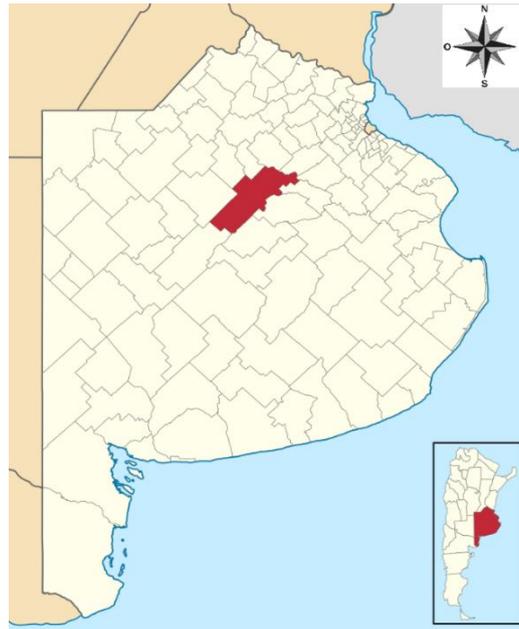
2022". Sin antecedentes registrados de aplicación de fertilizantes orgánicos y una textura franca (arena 54%, limo 38% y arcilla 7,3%). El análisis químico indica 4,45% de materia orgánica del suelo, 0,19% de N total, 9,8 ppm de N-NH_4^+ y 19,9 ppm de N-NO_3^-



Figura 5. Ubicación del área de estudio. Partido de Bahía Blanca (izquierda) y Chacra experimental Napostá, convenio MDA-UNS (derecha). El punto señalado indica el sitio donde se tomó el suelo.

2.2 Digerido anaeróbico:

Se utilizaron digeridos obtenidos de un biodigestor en operación continua perteneciente a la Escuela Agrotécnica Salesiana “Carlos A. Casares” (Figura 6), ubicada en Del Valle, partido de 25 de mayo, provincia de Buenos Aires.



a)



b)



c)

Figura 6. Ubicación del biodigestor. a) Partido de 25 de Mayo. b) biodigestor. c) Frente Escuela Agrotécnica Salesiana.

El digerido se tomó de un digestor de mezcla completa a gran escala que opera a una temperatura mesófila (25 °C) bajo un régimen continuo (tiempo de retención: 25 días) con una mezcla de estiércol de diferentes sistemas de producción en las siguientes proporciones volumétricas: 47% purín de ganado, 35% purín de cerdo y 3% estiércol de

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del digerido. Se indican la media y la desviación estándar (DE) (n=3). EC: conductividad eléctrica, Nt: nitrógeno total, Pav: P disponible, Pt: P total.

	EC	pH	Nt	Pav	Pt	N-NH ₄	N-NO ₃	Sólidos Totales %	Sólidos Volátiles %
	dS/m		%	ppm					
Media	12.07	8.00	0.21	15.30	22.84	949.67	43.40	2.21	41.79
DE	0.31	0.17	0.01	4.04	3.12	38.22	10.57	0.11	0.81

aves de corral. El porcentaje restante (15%) incluye suero lácteo y ensilado de maíz.

Se obtuvo una muestra final de 10 L y se almacenó a 4 °C hasta su uso en el ensayo de invernadero. Sobre los digeridos húmedos se determinó nitrógeno total Kjeldahl (NTK), amonio y nitrato (Locoli *et al.*, 2021). Las propiedades fisicoquímicas del digerido utilizado en este estudio se indican en la Tabla 2.

2.3 **Ensayo en invernáculo:**

Se prepararon macetas (3 dm³ de capacidad) con 2,36 kg de suelo (equivalente a 1,97 kg de suelo seco), y se aplicaron los tratamientos de fertilización, siguiendo un diseño completamente aleatorizado de un factor con cinco réplicas de cada tratamiento (n=5) (20 macetas en total). Los cuatro tratamientos fueron los siguientes: DA, fertilizante inorgánico (urea; 46% N), fertilizante combinado (50:50 DA: fertilizante inorgánico) y el control sin fertilizar (agua destilada). Luego de la primera fertilización se sembraron semillas de *Lolium perenne* L. (Guasch™, Bahía Blanca, Argentina) a una densidad de 0,8 g de semillas por maceta.

El DA, el fertilizante inorgánico y el fertilizante combinado se aplicaron en la superficie del suelo, a una dosis de 106 mg N-NH₄⁺ por kg de suelo seco, en un esquema fraccionado con cantidades iguales en las fechas de aplicación: 3 días antes de la siembra y 25 días después de la siembra.

2.4 Análisis de biomasa:

Durante el experimento se realizaron 2 cortes, cuando las plantas del tratamiento con mayor desarrollo alcanzaron 15 cm de altura, dejando un remanente de 4 cm de hojas. En cada corte (25 y 42 días pos-siembra), se registró el peso fresco y seco de la parte aérea (70°C, 48 h), y se calculó el peso seco acumulado con los datos registrados.

Las macetas se rotaron aleatoriamente cada semana y se mantuvieron bajo riego automático con aspersores dos veces al día durante 5 minutos en el invernadero del Departamento de Agronomía (Universidad Nacional del Sur), sin control adicional de otros parámetros.

2.5 Muestreo de suelo rizosférico:

Al final del ensayo, a los 42 días posteriores a la siembra, se muestreó el suelo rizosférico separando primero las plantas del suelo de la maceta. Luego, las raíces se sacudieron con cuidado para desprender el suelo suelto. Por último, el suelo rizosférico adherido a las raíces se recolectó cuidadosamente utilizando pinceles estériles. Las muestras de suelo se almacenaron a -80 °C en bolsas de muestreo estériles hasta la extracción de ADN.

2.6 Extracción de ADN:

El ADN se extrajo de 4 muestras de suelo rizosférico utilizando una combinación de lisis química y mecánica con el kit comercial ADN PuriPrep Suelo (Inbio Highway, Tandil, Argentina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN se realizó utilizando el kit QuantiFluor® dsDNA y un fluorómetro Quantus (Promega®, Madison, WI, EE. UU). La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.7 Cuantificación de genes del ciclo del N:

Se cuantificó por PCR en tiempo real la abundancia de los genes *amoA* de bacterias y de arqueas, y *nirK* y *nirS* de bacterias, como indicadores de la abundancia de microorganismos del ciclo del N (AOA, BOA y bacterias desnitrificantes, respectivamente).

Las reacciones de PCR se realizaron con un kit con SYBR Green como sistema de detección en un termociclador de tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems), utilizando protocolos optimizados para cada grupo (Morales *et al.*, 2022).

Los cebadores utilizados para los análisis moleculares se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores utilizados para qPCR.

Grupo	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	Referencia
BOA	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	Rotthauwe <i>et al.</i> , (1997)
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
AOA	amoA19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	624	Leininger <i>et al.</i> , (2006) Schauss <i>et al.</i> , (2009)
	CrenamoA616r48x	GCCATCCABCKRTANGTCCA		
<i>nirK</i>	nirK876	ATYGGCGG VAYGGCGA	160	Henry <i>et al.</i> , (2004)
	nirK1040	GCCTCGAT CAGRTRRTGGT		
<i>nirS</i>	nirSCd3aF	AACGYSAAGGARACSGG	425	Kandeler <i>et al.</i> , (2006)
	nirSR3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA		

La composición de la mezcla de reacción, el programa de amplificación de los genes y los rangos de las curvas estándar empleados se detallan en la Tabla 4.

Se prepararon curvas estándar con diluciones decimales de los genes respectivos, amplificados por PCR y clonados en plásmidos, para que sirvieran como referencia en los cálculos del número de copias (Figuras 7). Las eficiencias y R^2 de las curvas estándares de qPCR para BOA, AOA, genes de nitrito reductasa (*nirS* y *nirK*) se indican en las Figuras 8 a 11.



Figura 7. Cultivos de *Escherichia coli* DH5 α a partir de los cuales se extrajeron los plásmidos con los genes *amoA* de BOA, *amoA* de AOA, *nirK* y *nirS*, utilizados para la construcción de la curva estándar de referencia.

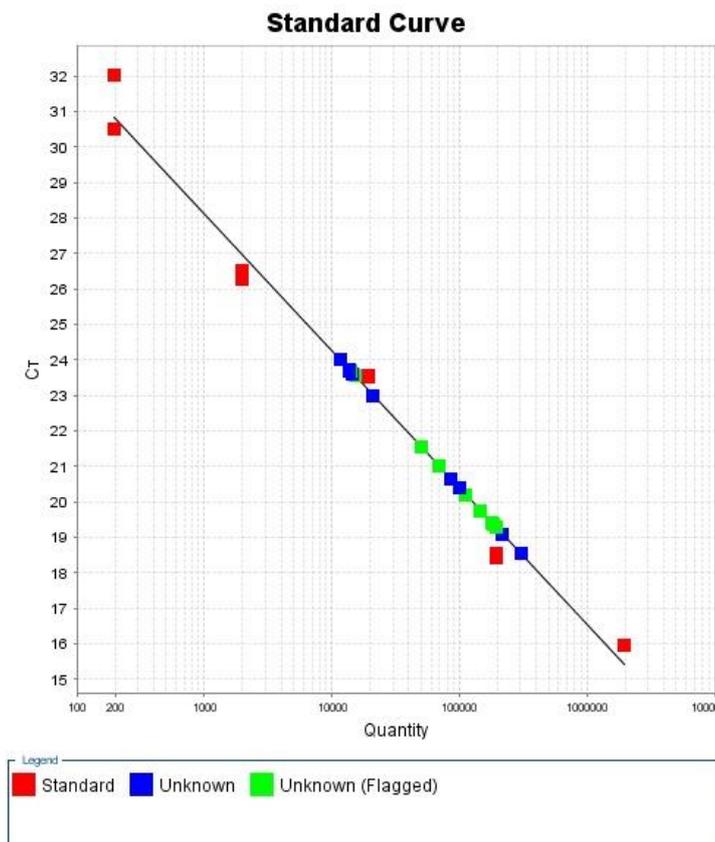


Figura 8. Curva estándar para el gen amoA_BOA. $R^2=0.986$, Ef%= 81,7%.

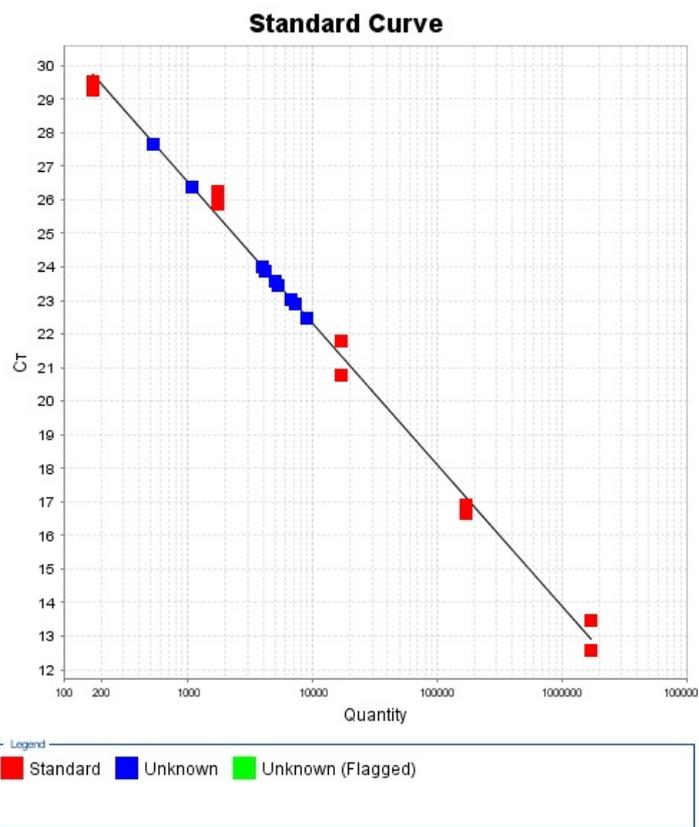


Figura 9. Curva estándar para el gen amoA_AOA. $R^2=0.977$. Ef%=81,3

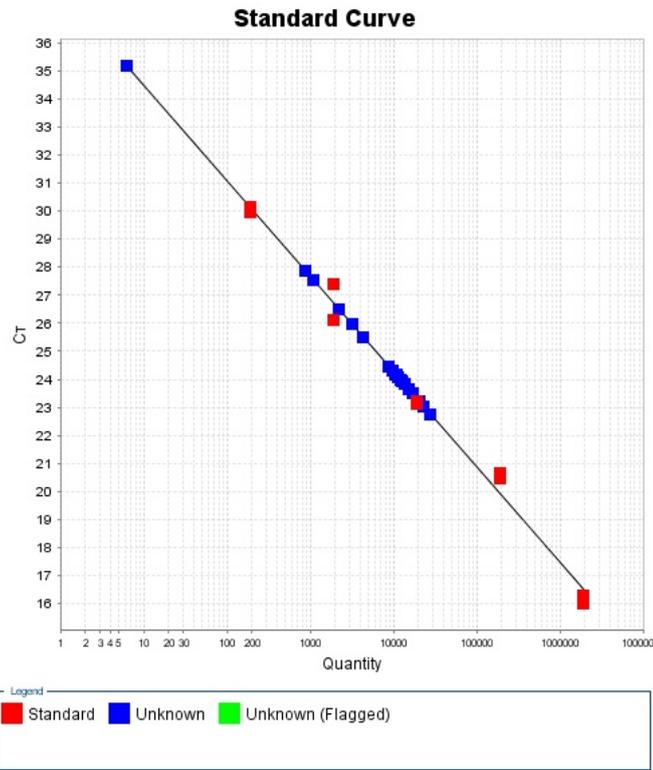


Figura 10. Curva estándar para el gen *nirK*. $R^2=0.991$. Ef%=96,8%

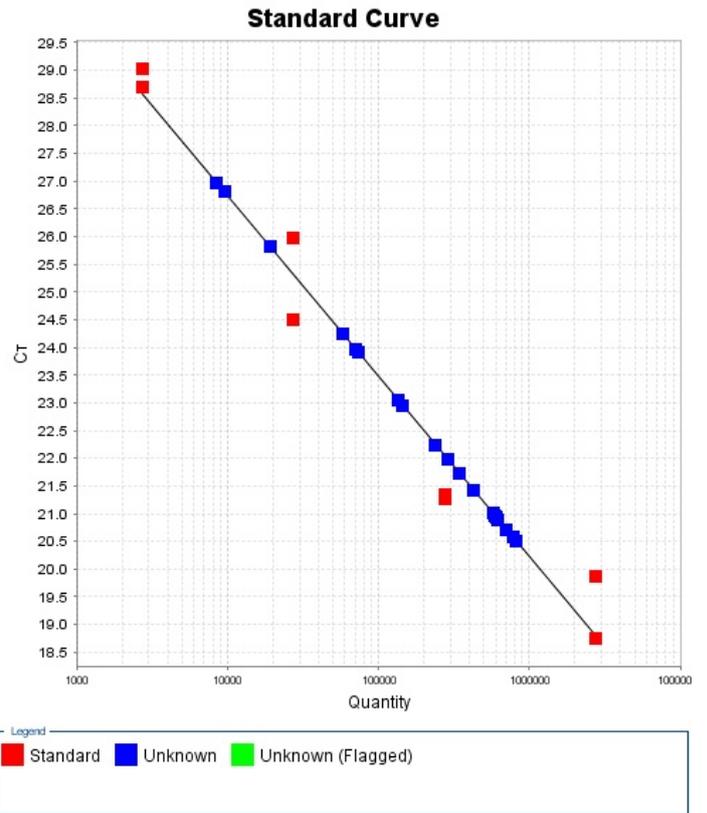


Figura 11. Curva estándar para gen *nirS*. $R^2=0.967$. Ef%= 102

Tabla 4. Información sobre preparación de las reacciones de Q-PCR y programas utilizados para cada uno de los genes.

Genes Reacción	<i>amoA</i> (AOA)	<i>amoA</i> (BOA)	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>
Volumen Final	15 μ l			
PCR iTaq Universal SYBR Green Supermix (2 x; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)	7,5 μ l			
Cebador directo (F) y reverso (R) (μ l)	0.9	0,45 F y 0,9 R	0,45	0,75
ADN (μ l)	1 μ l			
Agua bidestilada (μ l)	4,7	5,19	5,6	5
Programa: Amplificación	Preincubación a 95°; 1 ciclo			
	95°C - 20 s	95°C - 20s	95°C - 15 s	95°C - 15 s
	58°C - 30 s	55°C - 30 s	58°C - 30 s	60°C - 20 s
	72°C - 45 s	72°C - 45 s	72°C - 45 s	72°C - 45 s
	40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos
	Análisis de las curvas de fusión: 65°C- 95°C			
Curva estándar	10 ⁷ -10 ³ copias	10 ⁶ -10 ² copias	10 ⁷ -10 ² copias	10 ⁷ -10 ³ copias

2.8 Análisis estadísticos y diseño experimental

La producción acumulada de biomasa del raigrás y las abundancias de los grupos microbianos se analizaron mediante ANOVA simple ($\alpha=0,05$). Se analizaron las correlaciones entre abundancia de los distintos grupos microbianos y la biomasa seca acumulada mediante correlación de Pearson. Para la comparación de medias se utilizó test de prueba de Tukey (5%), utilizando Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA ACUMULADA

En la Tabla 5 se presentan los valores medios de biomasa acumulada observándose diferencias significativas entre los tratamientos analizados. El tratamiento Control (sin fertilizante) y la Urea no obtuvieron diferencias entre sí. Por otro lado, el tratamiento Digerido y Combinado presentaron mayor producción de biomasa que los dos tratamientos antes mencionados (Control y Urea, $p<0,01$), sin diferenciarse entre sí.

Tabla 5. Producción de biomasa acumulada en los diferentes tratamientos. Valores medios seguidos de la misma letra no difieren significativamente (Tukey, $\alpha=0,05$). g.l, grados de libertad; EEM, error estándar de la diferencia de medias.

Tratamientos	Biomasa acumulada (peso seco, g)
Control	1,79 A
Urea	2,25 A
Digerido	2,52 B
Combinado	2,52 B
<i>p-valor</i>	0,0097
<i>gl</i>	12
<i>EEM</i>	0,14

El uso de DA como fertilizantes ha generado resultados variables sobre el rendimiento de los cultivos. En el presente trabajo, la aplicación del digerido generó un aumento de la biomasa, resultados que coinciden con los de Bernal Calderón *et al.*, (2014) en legumbres, y los de Warnars & Oppenoorth (2014) en diferentes cultivos hortícolas y en

maíz, donde obtuvieron incrementos en los rendimientos y en la calidad de las cosechas mediante la aplicación de digeridos.

El incremento de la biomasa acumulada por parte del digerido en comparación con la aplicación de urea y el tratamiento control, puede deberse a que el DA no solo posee N como en el caso de la urea, sino que también incorpora nutrientes fácilmente disponibles para las plantas.

locoli (2018) sostiene que al aplicar DA se produce una rápida inmovilización microbiana del nitrógeno incorporado, el cual se mantiene dentro de la fracción más lábil de la materia orgánica, pudiendo liberarse dentro del ciclo del cultivo. A su vez Walsh *et al.*, (2012) y Perez Mata (2017) aseguran que el uso de DA como fertilizante aporta materia orgánica generando una rápida activación de la microbiota y regulando el ciclo de nutrientes.

En un estudio de un año de duración, se realizó un ensayo a campo con maíz fertilizado con DA de estiércol, observándose un rendimiento similar al obtenido con fertilizantes minerales y estiércol sin digerir (Vaneckhaute *et al.*, 2013). No obstante, hay investigaciones que reportan un rendimiento inferior cuando se aplicaron DA en cultivos de cereales (Svensson *et al.*, 2004). Estas diferencias en los resultados podrían deberse a diversos factores, lo que resalta la importancia de evaluar cada caso de manera particular para obtener datos más precisos.

3.2 ABUNDANCIA DE BOA, AOA, DESNITRIFICANTES

Tabla 6. Valores de medias y errores estándar de la media (EEM) de los diferentes tratamientos. Se denotan también el valor de probabilidad (p-valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0,05$).

Tratamientos	Número de copias (Log_{10}) / ng ADN			
	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>amoA_A</i>	<i>amoA_B</i>
Control	2,54 A	4,24 A	2,65 A	3,12 A
Urea	2,79 A	3,59 A	2,36 A	3,68 B
Digerido	2,89 A	4,36 A	2,02 A	3,88 BC
Combinado	2,90 A	3,61 A	2,31 A	4,02 C
p-valor	0,185	0,24	0,2123	0,0001
gl	12	12	10	12
EEM	0,12	0,32	0,19	0,05

No se observaron diferencias entre los tratamientos en la abundancia de los genes que codifican para nitrito-reductasa (*nirK*, *nirS*) (Tabla 6). Tampoco se detectaron efectos de los tratamientos sobre la abundancia del gen *amoA* que codifica para la enzima de membrana amonio monooxigenasa de las arqueas oxidantes del amoníaco (Tabla 6). En cambio, para las bacterias oxidantes del amoníaco, hubo un efecto significativo de los tratamientos ($p < 0,001$), sobre la abundancia del gen *amoA* (Tabla 6), coincidiendo con locoli (2018) que sugiere que las BOA tiene un mayor protagonismo en el proceso de nitrificación. El Control difirió de los otros tratamientos, siendo el que menor abundancia registró. La abundancia de *amoA* fue similar para los tratamientos Urea y DA, mientras que este último tuvo abundancia similar al tratamiento Combinado (combinación de ambas fuentes de fertilización). La mayor abundancia del gen *amoA* se registró en el tratamiento Combinado.

locoli *et al.*, (2018) investigaron recientemente cómo el uso de DA de diferentes fuentes, empleados como fertilizantes, afecta a las comunidades microbianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en suelos incubados. La abundancia de microorganismos responsables de este ciclo fue evaluada mediante PCR en Tiempo Real, enfocándose en los genes *amoA* de bacterias y arqueas oxidantes de amoníaco (BOA y AOA) y en los genes *nirS* y *nirK* de bacterias desnitrificantes. En esta ocasión se demostró que el uso de los DA favorecía un incremento de las BOA. Una explicación de estos resultados

puede deberse al pH del suelo, y el elevado aporte de N-NH_4^+ por parte de los DA y apoyaría resultados de Huang *et al.*, (2019). Estos autores observaron que a mayores adiciones de N aumentaron la comunidad de bacterias en mayor magnitud que las arqueas y esto puede deberse a que las poblaciones de BOA son más dinámicas y más sensibles a los cambios. Los resultados obtenidos en ese estudio fueron similares a los reportados en esta Tesis, coincidiendo en que la cantidad de bacterias eran mayores a las arqueas en los suelos estudiados. Asimismo, Bates *et al.*, (2011) al estudiar por pirosecuenciación 146 suelos representativos para los distintos tipos de suelos y ecosistemas del mundo, reportaron mayor abundancia de bacterias oxidantes que de arqueas oxidantes de amoníaco.

Ochoa *et al.*, (2015) respaldan los resultados obtenidos en este trabajo, al indicar que la fertilización nitrogenada aumenta significativamente la cantidad de BOA en el suelo, pero no tiene un efecto similar en las AOA, como también se reporta en Ouyang *et al.*, (2016). De la misma forma comentan que las AOA se encontrarían en mayor abundancia en grandes extensiones de agua o en suelos profundos y que particularmente jugarían un papel importante cuando la cantidad de NH_4^+ en suelos es escasa, mientras que lo contrario sucedería con las BOA. A su vez, explica que la forma en la que se suministra nitrógeno podría jugar un papel fundamental, siendo las AOA las que responden más a nitrógeno mineralizado o nitrógeno orgánico derivado del compost, mientras que la mayor actividad de las BOA se encontró con amoníaco derivado de fertilizantes inorgánicos (Ouyang *et al.*, 2016).

3.3 CORRELACIONES ENTRE BACTERIAS Y BIOMASA

Tabla 7. Cuadro de correlación de Pearson entre los genes estudiados y la biomasa acumulada. En negrita se muestran los coeficientes de correlación r que resultaron significativos y los p -valores correspondientes.

Correlación de Pearson: Coeficientes / Probabilidades					
	Biomasa	Copias <i>NirK</i>	Copias <i>NirS</i>	Copias <i>AmoA</i> BOA	Copias <i>AmoA</i> AOA
Biomasa	1	0,14	0,13	0,01	0,01
Copias de <i>NirK</i>	0,39	1	0,19	0,14	0,38
Copias de <i>NirS</i>	-0,39	-0,34	1	0,76	0,63
Copias de <i>AmoA</i> BOA	0,65	0,39	-0,08	1	0,04
Copias de <i>AmoA</i> AOA	-0,61	-0,24	0,13	-0,51	1

La Tabla 7 muestra los resultados de la correlación de Pearson entre las abundancias de los distintos genes y la biomasa acumulada. En la tabla, los valores de la correlación entre cada una de las variables se muestran en la diagonal inferior, mientras que los valores de significancia de las correlaciones se presentan en la mitad superior.

Los recuadros marcados representan los valores de p correspondientes a las correlaciones significativas entre las variables. La correlación entre *amoA* de BOA y la biomasa acumulada es fuerte, positiva ($r= 0,65$) y significativa ($p=0,01$). En contraposición, la correlación entre *amoA* de arqueas y la biomasa acumulada fue fuerte pero negativa ($r= -0,61$), también significativa ($p=0,01$). Esto significa que cuanto mayor fue la abundancia de arqueas oxidantes de amoníaco, menos biomasa se acumuló. Por último, la correlación entre las abundancias de los genes *amoA* de BOA y AOA resultó negativa ($r= - 0,51$) y significativa ($p=0,04$).

En el inciso anterior 3.2 lo explicado por Ochoa *et al.*, (2015) podrían respaldar las correlaciones que se encontraron entre los distintos microorganismos oxidantes.

Zabaloy *et al.*, (2017) encontraron correlaciones positivas entre el gen *amoA* bacteriano y la cantidad de $N-NO_3^-$. Si bien también observaron que las poblaciones de AOA eran más abundantes que las de BOA, y que las mismas mostraban en condiciones de bajas

concentraciones de amonio mayor competitividad, en los suelos agrícolas estudiados y fertilizados, las BOA resultaron mayores competidoras que las AOA.

Tanto Zabaloy *et al.*, (2017) como Feld *et al.*, (2015) y Carey *et al.*, (2016) concuerdan en que existe una fuerte correlación positiva entre la abundancia del gen *amoA* bacteriano y la cantidad de N-NO_3^- .

Allegrini *et al.*, (2021) encontraron que la fertilización con N no tenía influencia en AOA, pero si provocaba un aumento en las BOA. De manera similar a lo mencionado anteriormente, encontraron una respuesta positiva a las alta concentraciones de NH_4^+ proveniente de fertilizantes.

4. CONCLUSIONES

En base a la hipótesis planteada en el presente trabajo, se puede concluir que el DA derivado de estiércol, que surge como un subproducto de la producción de biogás, puede utilizarse ya sea de forma combinada o individualmente como fertilizante, obteniendo valores de producción de biomasa comparables a la obtenida con urea. Además, y en concordancia con lo reportado por otros autores la fertilización con DA puede presentar menos riesgos de lixiviación debido a su alta carga de N-NH_4^+ . También, contribuye a la nutrición del suelo aportando no solo N, sino otros nutrientes que no están presentes en fertilizantes sintéticos como la urea, activando la microbiota del suelo y regulando el ciclo de nutrientes presentes en el mismo.

5. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Alburquerque, J. A., de la Fuente, C., & Bernal, M. P. (2012). Chemical Properties of Anaerobic Digestates Affecting C and N Dynamics in Amended Soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 160, 15–22.
2. Allegrini, M., Morales, M. E., Villamil, M. B., & Zabaloy, M. C. (2021). Ammonia oxidizing prokaryotes respond differently to fertilization methods in oat rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 12, 746524. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.746524>
3. Aparcana Robles S., Jansen A. (2008). Estudio sobre el valor fertilizante de los productos del proceso de fermentación anaeróbica para producción de Biogas. German PrfoEC GmbH Germán Prof EC – Perú SAC. Lima, Perú
4. Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N. (2011). Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME Journal*. 5(5):908-17. doi: 10.1038/ismej.2010.171.
5. Bernal Calderón M P, Alburquerque Méndez J A, Bustamante Muñoz M A, Carrillo R C. (2011). Guía de utilización agrícola de los materiales digeridos por biometanización. Probiogas. Fondo Europeo de Desarrollo Regional. España Disponible en: [http://213.229.136.11/bases/ainia_probiogas.nsf/0/89A368DD73F7282DC125753F00587325/\\$FILE/PROBIOGAS_GuiaDigerido.pdf](http://213.229.136.11/bases/ainia_probiogas.nsf/0/89A368DD73F7282DC125753F00587325/$FILE/PROBIOGAS_GuiaDigerido.pdf)
6. Carey, C.J., Dove, N.C., Beman, J.M., Hart, S.C., Aronson, E.L., (2016). Metaanalysis reveals ammonia-oxidizing bacteria respond more strongly to nitrogen addition than ammonia-oxidizing archaea. *Soil Biology & Biochemistry*. 99, 158– 166.
7. Maddaloni, J. & Ferrari, L. (2005). Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. INTA y Facultad de Ciencias Agrarias, UNLZ. 2ª edición.
8. Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2017). InfoStat Software. Retrieved from <http://www.infostat.com.ar>
9. Feld, L., Hjelmsø, M.H., Nielsen, M.S., Jacobsen, A.D., Rønn, R., Ekelund, F., Krogh, P.H., Strobel, B.W., Jacobsen, C.S., (2015). Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes. *PLOS One*, 10(5):e0126080.

10. Frioni, L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. Orientación Grafica Editora, Buenos Aires. ISBN: 9789879260852
11. García Páez V. (2013). *Manual de Biogás. Conceptos Básicos. Beneficios de su producción y la aplicación de sus sub-productos*. Dirección de Sustentabilidad, Medio Ambiente y Cambio Climático. Argentina. Disponible en: https://www.gba.gob.ar/sites/default/files/agroindustria/docs/Manual_de_Biogas_01.pdf.
12. Gerardi, M. H. (2003). *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. Wastewater Microbiology Series. John Wiley & Sons, Inc.
13. Grant, C. Bittman, S. Montreal, M. Plenchette, C & Morel C. (2004). Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. *Canadian Journal of Soil Science*, 84(3), 279–293.
14. Henry, S., Baudoin, E., López-Gutiérrez, J. C., Martin-Laurent, F., Brauman, A., Philippot, L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.07.002>
15. Hinsinger, P., Bengough, A. G., Vetterlein, D., & Young, I. M. (2009). Rhizosphere: Biophysics, biogeochemistry, and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321:117-152.
16. Huang, L. Riggins, C. Rodríguez-zas, S. Zabaloy, C & Villamil, MB. 2019. Longterm N fertilization imbalances potential N acquisition and transformations by soil microbes. *Science of the Total Environment*, 691:562-571.
17. Iocoli, G; Orden, L; López, F; Gómez, M; Villamil, M; Zabaloy, M. 2021. Towards Sustainable Dairy Production in Argentina: Evaluating Nutrient and CO₂ Release from Raw and Processed Farm Waste. *Agronomy*, 11, 2595. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122595>
18. Iocoli, G. Rinland, M. Orden, L. Basualdo, Gómez, M. A, & Zabaloy, M. (2018). Resúmenes del Congreso CAMAYA 2018. Retrieved from <https://sites.google.com/view/camaya2018/programa/libroderes%C3%BAmens>
19. Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschierko, D., Bru, D., Philippot, L. (2006). Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5957–5962. <https://doi.org/10.1128/AEM.00439-06>
20. Keller, H., & Brenner, E. (2018). Fertilizer nitrogen dynamics in agricultural soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*.

21. Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C., Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442, 806–809. <https://doi.org/10.1038/nature04983>
22. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., & Stahl, D.A. (2015). Brock Biology of Microorganisms (14th ed.). Pearson.
23. Mendes, L., Tsai, S., Navarrete, A., Hollander, M., Veen, J., Kuramae, E. (2015). Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. *Microbial Ecology*. 70: 111
24. Morales, M. E., Allegrini, M., Iocoli, G. A., Basualdo, J., Villamil, M. B., & Zabaloy, M. C. (2022). Rhizospheric Microbiome Responses to Cover Crop Suppression Methods. *Agronomy*, 12, 2246.
25. Nkoa, R. (2013). Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 34 (2):473-492
26. Nyberg, K. (2006). Ammonia-oxidizing communities in agricultural soil incubated with organic waste residues. *Biology and Fertility of Soils*, 42(4), 315–323.
27. Ochoa, S., Erosa de la Vega, G., & Nevárez Moorillón, G. V. (2015). Ammonio-oxidizas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoamericana*, 33: 233-245. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v33n3/2395-8030-tl-33-03-00233.pdf>
28. Ouyang, Y. Norton, J. Stark, J. Reeve, J & Habteselassie Y. (2016). Ammonia oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 96: 4-15
29. Palau, E., Virginia, C. (2016). Digestión anaerobia de residuos de biomasa para la producción de biogás. Fundamentos. Universidad Politécnica de Valencia. España. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/68331/Palau%20-%20Digesti%C3%B3n%20anaerobia%20de%20residuos%20de%20biomasa%20para%20la%20producci%C3%B3n%20de%20biog%C3%A1s.%20Fundamentos..pdf?sequence=1>
30. Pérez Mata C. (2017). Comparación del efecto fertilizante de productos derivados del digestato obtenido en la digestión anaeróbica de residuos de supermercado. Tesis de Máster, Universidad de Oviedo. España.
31. Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 63(12), 4704–4712.
<https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997>
32. Schauss, K., Focks, A., Leininger, S., Kotzerke, A., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Sharma, S., Wilke, B. M., Matthies, M., Smalla, K., Munch, J. C., Amelung, W., Kaupenjohann, M., Schlöter, M., Schleper, C. (2009). Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. *Environmental Microbiology*, 11(2), 446–456. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01783.x>
 33. Snyder, C. & Bruulsema, T. (2007). Nutrient use efficiency and effectiveness in North America: Indices of agronomic and environmental benefit. International Plant Nutrition Institute. International Plant Nutrition Institute. Norcross, GA, USA. 4 p.
 34. Svensson, K., Odlare M, Pell M (2004). Effects of digestate on crop growth. *Journal of Agricultural Science*, 142, 461–467.
 35. Tobares, L. (2012). La importancia y el futuro del biogás en argentina. Trabajo seleccionado en el 3er. Congreso Latinoamericano y del Caribe de Refinación.
 36. Vaneeckhaute, C., Meers E, Michels E, Ghekiere G, Akoe F, Tack FMG (2013). Closing the nutrient cycle by using bio-digestion waste derivatives as synthetic fertilizer substitutes: A field experiment. *Biomass & Bioenergy*, 55, 175–189.
 37. Walsh J J, Rousk J; Edwarda-Jones G, Jones D L, Prysor Williams A. (2012). Fungal and bacteria growth following the application of slurry and anaerobic digestate of livestock manure to temperate pasture soils. *Biology and Fertility of Soils*, 48(8), Doi: 10.1007/s00374-012-0681-6.
 38. Warnars, L., Oppenoorth, H. (2014). El biol, el fertilizante supremo. Estudio sobre el biol, sus usos y resultados. Hivos people unlimited. ISBN/EAN 978-90-7043510-3. Disponible en: https://05271924766107149121.googlegroups.com/attach/7f24defad2889439/Bioslurry_a%20supreme%20fertiliser_HIVOS2014_esp.pdf?part=0.1&view=1&vt=ANaJVrGR1SuBKKyj3sSPXHav6z51WalUvrNMs2sBqJMOZJa2kIMEcAFWSR9Ovh8LKqzA4is9HKodTVoQxYuv1XpsL7dTPsj9a1UtiGyoE0QcxUYutyJfJ8
 39. Zabaloy MC, Allegrini M, Tebbe D, Schuster K, Gomez E. (2017). Nitrifying bacteria and archaea withstanding glyphosate in fertilized soil microcosms *Applied Soil Ecology*, 117-118:88-95.