



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Tesina de Grado en Ciencias Biológicas

Profundización en Genética y Evolución

# **Efecto de la aplicación de vinaza en cultivos de caña de azúcar: estudio de la comunidad bacteriana**

Autor: Sergio Wajswol Martella

Orientadora: Dra. Natalia Bajsa

Co-Orientadora: MSc. Daniella Senatore

Tribunal:

Dra. Natalia Bajsa

Adriana Montañez

Pilar Irisarri

Laboratorio de Ecología Microbiana

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1. Biocombustibles y generación de vinaza	3
2. Microorganismos del suelo	4
2.1 Actinobacterias	7
2.2 <i>Pseudomonas</i> fluorescentes	8
2.3 <i>Bacillus</i> spp.	8
2.4 Bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias solubilizadoras de fosfato	8
3. Actividad microbiana asociada al suelo	9
4. Diversidad y estructura de las comunidades microbianas	10
<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
1. Objetivo general	13
2. Objetivos específicos	13
3. Hipótesis	13
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
1. Descripción de los ensayos	14
2. Toma de muestras	18
3. Determinación de humedad	18
4. Cuantificación de bacterias por recuento en placa y por la técnica del número más probable (NMP)	18
4.1. Bacterias heterótrofas	18
4.2. <i>Pseudomonas</i> fluorescentes	19
4.3. <i>Bacillus</i> spp.	19
4.4. Fijadoras de nitrógeno	19
4.5. Solubilizadoras de fosfato	19

4.6. Actinobacterias -----	19
4.7. Amonificantes -----	19
5. Actividad microbiana -----	20
6. Extracción de ADN -----	20
7. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) -----	20
8. Secuenciación masiva -----	20
9. Análisis de datos -----	21
<b>RESULTADOS -----</b>	<b>22</b>
1. Abundancia de bacterias en suelos con y sin vinaza-----	22
2. Actividad microbiana -----	25
3. Estudio de la estructura de la comunidad bacteriana -----	26
3.1. Análisis de la comunidad bacteriana por secuenciación masiva -----	28
<b>DISCUSIÓN -----</b>	<b>35</b>
1. Abundancia de bacterias cultivables en suelos con y sin vinaza -----	35
2. Actividad microbiana -----	38
3. Estudio de la estructura de la comunidad bacteriana -----	39
<b>CONSIDERACIONES FINALES -----</b>	<b>41</b>
<b>ANEXOS -----</b>	<b>43</b>
1. Medios de cultivo -----	43
2. Reactivo de Nessler -----	44
3. Secuencia de cebadores utilizados -----	45
4. Tablas de abundancia -----	46
5. Respirometría -----	47
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----</b>	<b>48</b>

## RESUMEN

El bioetanol es una fuente de energía alternativa, y en Uruguay específicamente, todos los combustibles deben contener bioetanol al menos en un 5% respecto al volumen total. Una de las etapas de la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar es la de destilación, al finalizar esta etapa se obtiene un líquido denominado vinaza que contiene en gran medida materia orgánica, potasio, azufre, fósforo, nitrógeno y otros elementos. La acumulación de este efluente representa una problemática a no ser que sea tratado correctamente, ya que el vertido sin previo tratamiento a un curso de agua es inviable. La composición mineral de la vinaza sugiere que podría ser utilizada como biofertilizante, aportando nutrientes a los cultivos. Existen interacciones entre los microorganismos y los cultivos que afectan el crecimiento de los mismos, así como también entre los microorganismos y los suelos, afectando propiedades físicas y químicas de estos. Al aplicar vinaza, la actividad microbiológica del suelo podría verse afectada y por ello es necesario estudiar el efecto de la vinaza sobre la calidad del suelo, el crecimiento y sanidad de los cultivos.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar los cambios de la comunidad bacteriana del suelo tratado con vinaza aplicada como fertilizante en cultivos de caña de azúcar, para lo cual se tomaron muestras de dos sitios con suelos distintos (L1 y LB2) representativos de la zona (ALUR- Bella Unión), sin tratar y un mes después de la aplicación de distintos tratamientos: vinaza en dos concentraciones ( $150\text{m}^3/\text{ha}$ ,  $300\text{m}^3/\text{ha}$ ), fertilizante químico, y una parcela de cada suelo como control sin tratar. Con las muestras obtenidas se determinó la abundancia de algunos grupos bacterianos considerados importantes en cuanto a la sanidad del suelo por técnicas clásicas de cultivo, se midió la actividad microbiana mediante respirometría y se evaluó la diversidad y estructura de la comunidad bacteriana por la técnica molecular de secuenciación masiva.

Los resultados de abundancia y actividad microbiana no mostraron diferencias significativas para los distintos tratamientos respecto al control para ninguno de los suelos. Los datos obtenidos por secuenciación masiva fueron analizados siguiendo el protocolo de análisis bioinformático de Qiime, mediante el cual se construyeron los gráficos de diversidad alfa y beta, de abundancia por phylum y de abundancia por clase. La alfa diversidad obtenida indicó que la secuenciación llevada a cabo fue correcta en relación al esfuerzo de muestreo, no se observó agrupación de las muestras secuenciadas en los análisis multivariados (beta diver-

sidad) y no hubo diferencias significativas en cuanto a la composición de la comunidad bacteriana un mes pasada la aplicación de vinaza ( $300\text{m}^3/\text{ha}$ ) para los gráficos de abundancia obtenidos, salvo por un aumento de la clase clostridia en el suelo L1.

Estos resultados indican que la aplicación de vinaza en las dosis y tiempos evaluados (150 y  $300\text{ m}^2/\text{há}$  por de 1 mes) no tuvo efecto sobre las comunidades bacterianas del suelo con las técnicas utilizadas para su estudio.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Biocombustibles y generación de vinaza

Uno de los mayores problemas para la sociedad en la actualidad es cubrir la gran demanda energética e intentar proveer la misma en forma sustentable (Hahn-Hägerdal et al., 2006). En Uruguay el artículo 1 de lo dispuesto en la ley N° 18.195 referente a los agrocombustibles establece que “Se tiene por objeto el fomento y la regulación de la producción, la comercialización y la utilización de agrocombustibles (Alcohol carburante y Biodiesel). Asimismo, tiene por objeto reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, contribuyendo al desarrollo sostenible del país.” (Ley N° 18.195 Montevideo, 2007 – ALUR). Para lograr dicha reducción se producen biocombustibles de primera generación, los más ampliamente difundidos son el biodiesel y el bioetanol. Este último representa más del 90% del total de biocombustibles que se utilizan actualmente en el mundo (Serna et al., 2011), además de ser el de mayor producción en Uruguay, donde a partir del 31 de diciembre de 2014, se incorpora a los combustibles al menos un cinco por ciento (5%) sobre el volumen total de la mezcla del biocombustible y la nafta (gasolina) (Ley N° 18.195 Montevideo, 2007 – ALUR- Artículo 6°).

En Uruguay, la materia prima utilizada para la producción de bioetanol es de origen nacional y consiste en cultivos de caña de azúcar, a raíz de lo cual se generan varios subproductos. Entre ellos se encuentra la vinaza, efluente con alto potencial contaminante debido a su riqueza en materia orgánica, bajo pH, corrosividad elevada y altos índices de demanda biológica de oxígeno, sumado a la elevada temperatura con la cual abandona los destiladores. Por otro lado, por estar constituida principalmente de materia orgánica en forma de ácidos orgánicos y nutrientes como K, Ca, N, S y Mg la vinaza posee un alto potencial de uso como biofertilizante (Rossetto, 1987).

ALUR (Alcoholes del Uruguay S.A.) produce 30.000 m<sup>3</sup> de bioetanol al año, generándose aproximadamente 8 litros de vinaza por cada litro de etanol, acumulándose el efluente a no ser que sea tratado correctamente. Debido a su elevado volumen, muchos países han buscado alternativas para el tratamiento de la misma entre las que se encuentran el fertirriego, la concentración y posterior fertirriego, la utilización en producción de biogás y posterior fertirriego, concentración y utilización en alimento en raciones para animales (Christofoletti et al., 2013). De las anteriores la más utilizada a nivel mundial es el fertirriego con el objetivo de sustituir el uso parcial o total de fertilizantes químicos por vinaza, debido a

que no requiere de grandes inversiones, posee un bajo costo de mantenimiento a nivel económico y una baja complejidad (Santana y Machado, 2008). Sin embargo, al aplicar vinaza a los cultivos la actividad microbiológica del suelo podría verse afectada, factor que afecta el ciclado de nutrientes, fertilidad y producción de los suelos (Chen et al., 2003).

## **2. Microorganismos del suelo**

La fertilidad del suelo depende de elementos ambientales, físicos, químicos, de la materia orgánica presente en el suelo y por lo tanto de la actividad microbiana del mismo (Chen y Avnimelech, 1986). Los microorganismos afectan la fertilidad porque están involucrados en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes a través de diversos procesos, durante los cuales también producen compuestos con relevancia climática que son liberados a la atmósfera desde el suelo. Estas reacciones son llevadas a cabo por microorganismos especializados que coexisten en el suelo y se encuentran distribuidos en el espacio de manera heterogénea (Varma et al., 2005). La distribución heterogénea acarrea una problemática al momento de su estudio ya que se generan microhábitats con condiciones óptimas que permiten el crecimiento de comunidades microbianas a pequeña escala; es por ello que es recomendable tomar muestras compuestas, para evitar incurrir en errores o sesgo causado por poblaciones dominantes (Kirk et. al., 2004).

Dos parámetros son importantes cuando se evalúa la significancia de los microorganismos en el suelo: la abundancia y la diversidad. Mientras la abundancia puede aumentar o disminuir en cortos períodos en respuesta a diferentes prácticas de manejo, la diversidad es más importante para poder comprender la significancia funcional de los microorganismos en un sitio dado (Venkateswarlu y Srinivasarao, 2013). Es por esto que al utilizar fertilizantes para aumentar la cantidad de nutrientes presentes, ya sean orgánicos o inorgánicos, hay que tener en cuenta que pueden afectar a los microorganismos del suelo, lo cual puede acarrear cambios en la actividad y en la composición de la comunidad microbiana (Nakhro y Dkhar, 2010). Para poder detectar los efectos causados por los distintos tratamientos agrícolas en los suelos sobre las comunidades microbianas, es necesario aplicar técnicas para determinar su tamaño, composición y funcionamiento (Thwaites, 2011). Aun así, la interrogante de si un determinado proceso ecológico es llevado a cabo por comunidades bacterianas que son estrictamente similares estructuralmente o si pueden ser realizados por otras completamente diferentes según el tipo de suelo, sigue sin ser resuelta (Varma et al., 2005).

Interacciones entre plantas y microorganismos a nivel de la rizósfera cumplen un rol muy importante para la transformación, movilización, solubilización de un pool de nutrientes y la absorción y aprovechamiento de los mismos por parte de la planta. Estas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), generalmente actúan a través de tres vías diferentes: síntesis de compuestos particulares utilizados por las plantas, facilitando la absorción de nutrientes desde el suelo por parte de las plantas y previniendo las infecciones y enfermedades (Hayat et al., 2010).

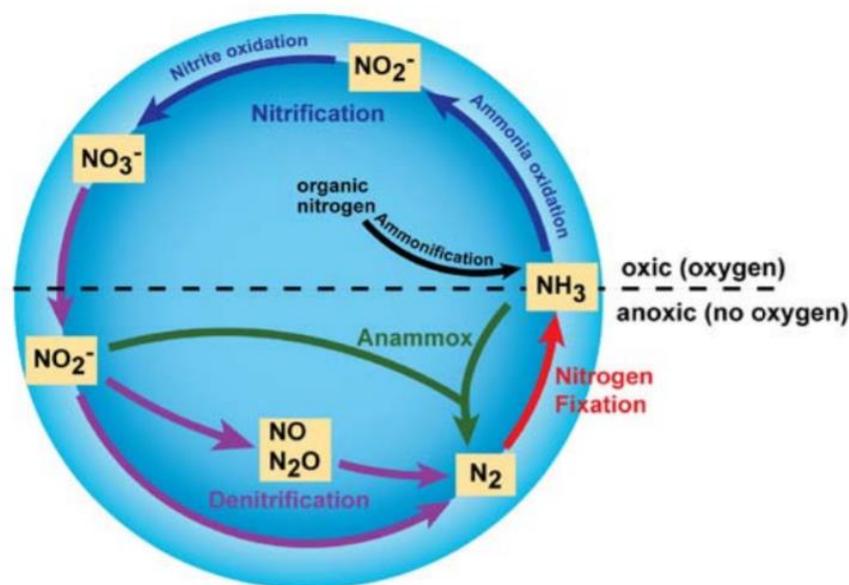
Debido a la actividad de cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, éstos son considerados los géneros principales de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Kishore et al., 2006).

Las interacciones entre rizobacterias y plantas forman parte de ciclos biogeoquímicos como el ciclo del fósforo, del nitrógeno y del hidrógeno, generando así cambios atmosféricos y a nivel del suelo.

El fósforo es un nutriente esencial para todas las formas de vida y desempeña un papel fundamental en la mayoría de las reacciones bioquímicas (Westheimer, 1987). Forma parte de moléculas como ARN, ADN y ATP y es considerado el segundo nutriente más importante para las formas de vida luego del nitrógeno. La mayoría de los suelos contienen una reserva de fósforo la cual casi en su totalidad se mantiene inerte por encontrarse en un estado químico inaccesible, mientras que un porcentaje aproximado del 10% ingresa al ciclo del cual participan plantas y animales (Ruttenberg, 2003). Es por esto que se vuelven esenciales los fertilizantes de fósforo, y que si bien el fósforo aportado por los mismos se encuentra en un estado disponible para las plantas, rápidamente reacciona siendo cada vez menos soluble y por lo tanto más inerte (Kucey et al., 1989). Las reservas globales de fósforo se encuentran almacenadas en tres grandes reservorios: suelos, rocas y organismos vivos; la erosión de las rocas y suelos es la principal fuente de obtención de fósforo y se lleva a cabo mediante la disolución de minerales que contienen fósforo como la apatita. Durante la conversión desde formas inertes del fosfato hasta su solubilización en forma de ortofosfato ocurren múltiples reacciones geoquímicas y bioquímicas a través del ciclo del fósforo, entre las que se encuentran las reacciones de solubilización que se dan mayormente debido a la liberación de ácidos por parte de microorganismos. Estos ácidos, entre otras funciones, intervienen en la quimiotaxis microbiana y detoxificación de los metales actuando en forma secundaria sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico (fosfato dicálcico, fosfato tricálcico, y roca fosfórica), generando además una acidificación del suelo que facilita la absorción de fósforo

(Paredes, 2010). Durante el proceso de mineralización algunas bacterias sintetizan las enzimas fosfatasas, que serán alcalinas o ácidas según las propiedades del suelo, y que son las enzimas encargadas de la hidrólisis de enlaces éster del fosfato orgánico. Estas bacterias solubilizadoras de fosfato generan más fosfatos de los que requieren para su propio metabolismo y crecimiento, quedando libre para interactuar en el medio donde puede ser incorporado por plantas y otros organismos (Ruttenberg, 2003).

Otro de los grandes limitantes en el crecimiento de los cultivos, por ser uno de los principales nutrientes esenciales de biomoléculas de gran importancia como los aminoácidos, ARN, ADN y clorofilas entre otras proteínas, es el nitrógeno. A pesar de existir enormes reservas de nitrógeno (N) en la atmósfera (este representa el 78% de la misma), es inaccesible para la mayoría de los organismos vivos, limitando así la productividad en muchos ecosistemas. El N presenta muchos estados de oxidación y formas químicas y sufre transformaciones entre un estado y otro por parte de microorganismos que participan en el ciclo del nitrógeno (Francis et al., 2007). El ciclo del N es central para la biogeoquímica del planeta, debido a que en el mismo, el N fluye desde la atmósfera hacia los suelos terrestres y marinos (Figura 1).



**Figura 1:** Esquema del Ciclo del Nitrógeno (Nature Education 2010).

El nitrógeno molecular inerte es reducido a compuestos de amonio a través de procesos de fijación biológica de nitrógeno (FBN), nitrificación, desnitrificación, reacciones anamox, y amonificación (Fowler et al., 2013). A pesar de existir gran diversidad de microorganismos

capaces de llevar a cabo la fijación biológica de N, todos ellos presentan actividad del complejo enzimático de la nitrogenasa que cataliza la reducción de  $N_2$  a  $NH_3$  (amoníaco). Esto convierte al complejo de la nitrogenasa en un excelente marcador molecular para la posible actividad fijadora de nitrógeno y permite una más fácil y rápida identificación de microorganismos fijadores de N.

El hidrógeno es un subproducto de la fijación de nitrógeno, pero también se ha estudiado su fijación por parte de microorganismos que presentan genes asociados al cluster de la 5[NiFe]-hidrogenasa, siendo estos genes los que codifican para las subunidades hhyS y hhyL de la hidrogenasa, presentes en Actinobacteria, Proteobacteria, Chloreflexi y acidobacteria (Meredith et al., 2014). Aproximadamente el 5% de la ganancia fotosintética diaria de una planta se pierde a causa de la producción de hidrógeno por lo cual la fijación del mismo por parte de bacterias es un proceso de gran importancia.

Muchos de los procesos descritos en los ciclos biogeoquímicos son llevados a cabo por los microorganismos estudiados en esta investigación por su posible utilización como promotores del crecimiento vegetal.

## **2.1 Actinobacterias**

El filo Actinobacteria es uno de los filios principales del dominio *Bacteria*. La clase Actinobacteria contiene seis órdenes: Acidimicrobiales, Rubrobacterales, Coriobacterales, Bifidobacteriales, Actinomycetales, y Nitriliruptorales (Suela et al., 2013). Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en los ecosistemas terrestres más que en cualquier otro medio, sobre todo en suelos alcalinos y suelos ricos en materia orgánica (Barka et al., 2016), donde participan en un rol fundamental de reciclaje de biomateriales por descomposición y formación de humus. Son bacterias Gram positivas muy variables a nivel morfológico y fisiológico que presentan un contenido GC muy elevado en su ADN. Comparten una sinapomorfía única a nivel molecular que ha aportado mucha información a nivel taxonómico, la inserción homóloga de aproximadamente 100 nucleótidos entre las hélices 54 y 55 del gen del ARNr 23S (Roller et al., 1992). A pesar de esto, los genomas que han sido secuenciados hasta el momento presentan una alta heterogeneidad reflejo de la biodiversidad presente en el filo (Ventura et al., 2007).

Este filo presenta una gran importancia a nivel biotecnológico debido a su uso en medicina, agricultura e industria. Del género *Streptomyces* se obtienen el 80% de los antibióticos, así

como también produce una amplia variedad de metabolitos secundarios con distintas actividades, que pueden ser anti-fúngicas, anti-tumorales y herbicidas (Omura et al., 2001).

## **2.2 *Pseudomonas fluorescentes***

Las *Pseudomonas* fluorescentes son de particular interés debido a que determinadas cepas poseen la habilidad de colonizar la rizósfera a una alta densidad y así competir con otros microorganismos (Mark et al., 2006). La lista de efectos beneficiosos respecto a la utilización de *Pseudomonas* spp. en suelo se encuentra en continuo crecimiento y entre ellas se encuentran su actividad promotora directa del crecimiento en plantas, producción de metabolitos anti-fúngicos, inducción de resistencia sistémica para hongos, bacterias, virus, insectos y nemátodos, tolerancia frente a estrés abiótico, interacciones con bacterias del género *Rhizobium* (Cano, 2011). La producción de AIA (ácido indolacético), amonificación, solubilización de fosfato y producción de sideróforos además de la actividad AAC (ácido aminociclopropano-1-carboxílico) desaminasa son algunos de los mecanismos de acción conocidos de promoción del crecimiento vegetal por parte de cepas de *Pseudomonas* (Dey et al., 2004).

## **2.3 *Bacillus* spp.**

*Bacillus* es uno de los géneros con mayor potencial estimulante del crecimiento vegetal debido a su capacidad de formación de esporas resistentes y otras características de este género como presencia de múltiples capas de pared celular, secreción de péptidos antibióticos, enzimas extracelulares las cuales favorecen su supervivencia ante condiciones adversas del ambiente por períodos sostenidos de tiempo (Kumar et al., 2011). Son aisladas generalmente de la rizósfera aunque son muy comunes las formas endófitas de cepas de *Bacillus* spp.. Algunas especies como *Bacillus subtilis* son conocidas por su influencia positiva en el crecimiento, vitalidad, y resistencia a patógenos en las plantas, generando muchas veces un aumento en la capacidad de producción (Wahyudi et al., 2011). Los principales mecanismos por los cuales se logra la promoción del crecimiento son: la estimulación directa por producción de fitohormonas, solubilización y movilización de fosfato e inducción de la resistencia sistémica a patógenos (Choudhary y Johri, 2009).

## **2.4 Bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias solubilizadoras de fosfato**

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) atmosférico a formas químicas asimilables por los organismos superiores sólo puede ser efectuada por procariotas de los dominios *Bacteria* y

*Archaea*. Los microorganismos que convierten el nitrógeno gas ( $N_2$ ) en amoníaco lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático altamente conservado llamado nitrogenasa, que está constituido por dos metaloproteínas: la proteína (I), llamada hierro-molibdeno-proteína, y la proteína (II), llamada hierro-proteína (Baca et al., 2000).

La mayoría de la fijación biológica de nitrógeno es llevada a cabo por diazótrofos en simbiosis con leguminosas. No obstante bajo condiciones específicas, pH neutral, bajos niveles de nitrógeno fijado, y grandes cantidades de carbono (DeLuca et al., 1996) ciertas bacterias de vida libre (cianobacterias, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, entre otras) interactúan con plantas C3 y C4 (como caña de azúcar, arroz, maíz, algodón y trigo) y pueden fijar cantidades significativas de nitrógeno (hasta 60 kg de nitrógeno ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) (Bürgmann et al., 2004), aumentando el crecimiento vegetativo de las mismas así como la producción de grano (Kennedy et al., 2004).

El fósforo es uno de los nutrientes esenciales más limitante para las plantas, aún cuando en el suelo existen grandes reservas del mismo. Esto se debe a que sólo una pequeña parte del fósforo total existente puede ser utilizado por las plantas debido a que el mismo se encuentra mayormente en sus formas insolubles y las plantas únicamente pueden utilizar las formas solubles del mismo: monobásica ( $H_2PO_4^-$ ) y dibásica ( $HPO_4^{2-}$ ) (Bhattacharyya y Jha, 2012). El fósforo sufre adsorción y reacción de precipitación con cationes presentes en el suelo, en particular el hierro, aluminio y calcio por lo cual se tendría que utilizar cantidades muy elevadas de fertilizante químico para alcanzar resultados óptimos, lo cual causa pérdidas tanto a nivel ecológico como económico (Sharma et al., 2011).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato generalmente solubilizan fósforo inorgánico a través de la producción de ácidos orgánicos, como ser el ácido cítrico, glutámico, succínico, láctico, oxálico, maleico, fumérico, tartárico o  $\alpha$ -cetobutírico. Se han reconocido efectos benéficos de las mismas al ser aplicadas en cultivos de caña de azúcar, al comparar tratamientos donde se aplicaron estas bacterias con otros tratamientos carentes de las mismas (Sundara et al., 2002). Los géneros más conocidos que contienen cepas capaces de solubilizar fosfato son *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, y *Serratia* (Sharma et al., 2011).

### **3. Actividad microbiana asociada al suelo**

La actividad microbiana es un reflejo de los procesos que ocurren en el suelo debido a la presencia de bacterias y hongos en distintas proporciones según el tipo de suelo. Esta actividad es determinante para el del ciclado de nutrientes, así como también de la descomposición de la materia orgánica (Chen et al., 2003). La mayoría de los microorganismos del suelo son heterótrofos lo que significa que tienen la propiedad de degradar materia orgánica, obteniendo energía que necesitan para su desarrollo. Utilizando esta propiedad se puede determinar la actividad metabólica de los microorganismos del suelo mediante la medida del desprendimiento del CO<sub>2</sub> derivado de la respiración en un determinado período. Esto nos dará idea de la actividad microbiológica existente en el suelo (Chakraborty et al., 2011). Así se pueden evaluar las diferentes respuestas de los microorganismos frente a factores de estrés que podrían afectar su metabolismo, modificando indirectamente las propiedades del suelo: factores como ser la concentración de metales, sales o contenido de agua disponible en el medio. Esta medida es difícil de evaluar debido a la diversa estructura de las comunidades del suelo, y a la distinta interacción de cada grupo microbiano en relación a los factores antes mencionados. La actividad varía en función de muchos factores, como el uso del suelo, mineralogía, cobertura vegetal, prácticas de manejo, calidad de los residuos que entran al sistema, factores ambientales, entre otros (Ramos y Dávila, 2008). La medida de la actividad microbiana es considerada un bioindicador de la calidad y sustentabilidad, permite comprender procesos degradativos que ocurren a nivel del suelo y aporta información para mantener la biodiversidad de manera tal que los suelos mantengan su resistencia y resiliencia.

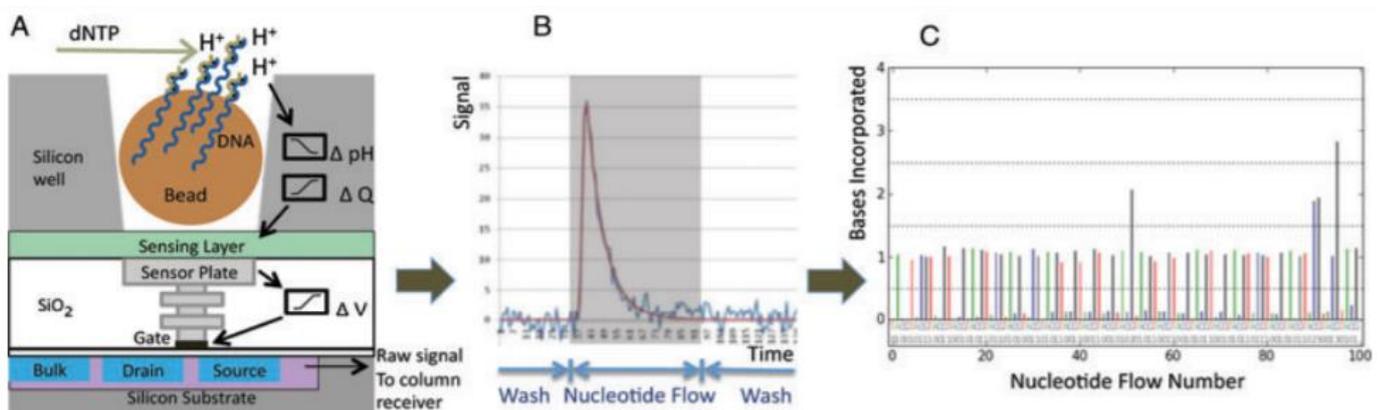
### **4. Diversidad y estructura de las comunidades microbianas**

Históricamente las técnicas que se utilizaban eran las de cultivo en el laboratorio, pero actualmente se sabe que menos del 1% del total de bacterias son cultivables bajo estas técnicas (Horner-Devine et.al., 2004; Ritz 2007). Los métodos dependientes de cultivo son baratos y rápidos; aunque pueden proveer información sobre el componente activo heterótrofo de la población presentan dificultades al momento de analizar la diversidad de una comunidad bacteriana. Se sabe que generan desvíos de valores reales debido a la imposibilidad de reproducir los requerimientos metabólicos y fisiológicos de la mayoría de los microorganismos *in vitro* (Nadkarni et al., 2009).

De manera de superar los inconvenientes que acarrearán las técnicas de estudio clásicas, se han desarrollado técnicas de análisis a nivel molecular que se basan en el estudio del ARN

o ADN. Mediante la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras ambientales se pueden utilizar técnicas como PCR a través de la cual luego de aislar el ADN se amplifica el mismo utilizando cebadores universales o específicos. Los productos de PCR pueden ser aislados posteriormente en base a sus propiedades de desnaturalización para llevar a cabo técnicas de fingerprinting (DGGE<sup>1</sup>, TGGE<sup>2</sup>, T-RFLP<sup>3</sup>, SSCP<sup>4</sup>, RISA<sup>5</sup>, LH-PCR<sup>6</sup>) o mediante técnicas de hibridación para llevar a cabo microarrays. Otro enfoque posible es realizar un PCR cuantitativo (qPCR), técnica que se basa en la generación de una señal fluorescente, que luego es detectada por un equipo en cada ciclo de la reacción de PCR (Kolb et al., 2003).

Finalmente, a partir de lo obtenido por PCR, se pueden llevar a cabo técnicas de secuenciación masiva, como por ejemplo la secuenciación utilizando el equipo Ion Torrent (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de secuenciación utilizando ion Torrent. (A) La “bead” (soporte al cual se une el ADN) presenta una simple hebra de ADN, la cual se encuentra unida tanto al primer como a la polimerasa. Al unirse una base nucleotídica específica (ACGT) se libera  $H^+$  y el complejo queda libre para interaccionar con la siguiente base. El protón liberado genera una diferencia de carga en el sensor que es transportada a través del transistor en forma de diferencia en el potencial de voltaje ( $\Delta V$ ) hacia el sensor. (B) Las señales en forma de pH son analizadas por el sensor a altas frecuencias y luego interpretadas por un modelo el cual establece la base nucleotídica correspondiente. (C) Los pasos anteriores se repiten dando lugar a una señal única para cada tipo de información (Tipo de base, incorporación fallida) obteniendo así la secuencia completa al finalizar el proceso (Merriman et al., 2012).

Ion Torrent basa su tecnología en un chip con sensor CMOS (sensor que detecta la luz utilizando tecnología de semiconductor complementario de óxido metálico “CMOS”) que puede llevar a cabo la recolección de hasta billones de reacciones de secuenciación simultáneas. El sensor que se encuentra acoplado a un transistor posee sensibilidad para medir los protones que son liberados del sitio 3'OH de la cadena en crecimiento durante la reacción de polimerización. Aunque podría utilizarse una tecnología que reconozca tanto protones como pirofosfato por lo general se utiliza en el Ion Torrent la detección únicamente de protones ( $H^+$ ). La concentración local de  $H^+$  genera una diferencia de potencial lo cual lleva a que

diferentes corrientes atraviesen el transistor, según cual sea el nucleótido que está siendo agregado a la cadena en crecimiento. La detección se da midiendo la electroquímica durante la reacción de síntesis y esto permite prescindir de utilizar bases marcadas (Merriman et al., 2012).

# OBJETIVOS

## 1. Objetivo general:

Evaluar los cambios de la comunidad bacteriana del suelo tratado con vinaza aplicada como fertilizante en cultivos de caña de azúcar.

## 2. Objetivos específicos:

2.1) Determinar el efecto de la vinaza sobre la abundancia y diversidad de la comunidad bacteriana.

2.2) Determinar el efecto de la vinaza sobre la actividad microbiana.

# HIPÓTESIS

La aplicación de vinaza en suelos cultivados con caña de azúcar modifica la comunidad bacteriana alterando su abundancia, diversidad y actividad.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Descripción de los ensayos

Los muestreos se llevaron a cabo en predios de productores de caña de azúcar, localizados en las proximidades de la destilería de ALUR, ubicada al noroeste del departamento de Artigas en la ciudad de Bella Unión (Figura 3).



**Figura 3.** Mapa de la zona de estudio, se observan resaltadas las ubicaciones de la planta de ALUR y los sitios de los ensayos (L1, LB2), y la ciudad de Bella Unión.

Las muestras fueron tomadas a partir de dos ensayos instalados en suelos diferentes (L1 y LB2), contrastantes física (tablas 1 y 2) y químicamente (tablas 3 y 4) representativos de la zona por su extensa distribución. Para la selección se tuvo en cuenta que fueran suelos con poca o ninguna erosión, que los mismos no hayan recibido vinaza previamente ni fertilizante

recientemente y la disponibilidad de agua para cubrir los requerimientos del cultivo de caña durante todo su ciclo.

**Tabla 1.** Descripción del perfil de suelo L1 según carta detallada de suelos de CALNU

Horizonte	Profundidad (cm)	Características
A	0-15	Franco arenoso, transición gradual
AB	15-30	Franco arcillo arenoso, transición clara
Bt1	30-60	Arcillo arenoso a arcilloso con arena, transición clara
Bt2	60-90	Arcilloso con gravilla, transición clara
BC	90-120	Arcilloso a arcillo limoso

**Tabla 2.** Descripción del perfil de suelo LB2 según carta detallada de suelos de CALNU

Horizonte	Profundidad (cm)	Características
A	0-15	Arcillo limoso, con cantos grandes de hasta 5cm, transición gradual
Bt1	15-30	Arcillo limoso a arcilloso con cantos menores a 1cm, transición gradual
Bt2	30-60	Arcilloso con cantos menores a 1 cm, transición gradual
BC	60-90	Arcilloso a arcillo limoso con cantos menores a 1 cm, transición clara
C	90-120	Arcilloso a arcillo limoso con cantos menores a 1 cm

**Tabla 3.** Suelo L1. Propiedades químicas-distribución en profundidad. Muestreo realizado previo a la aplicación de vinaza y fertilización.

Profundidad (cm)	pH (H <sub>2</sub> O)	pH (KCL)	Ca (mg Kg <sup>-1</sup> )	Na (mg Kg <sup>-1</sup> )	K (mg Kg <sup>-1</sup> )	Mg (mg Kg <sup>-1</sup> )	P (mg Kg <sup>-1</sup> )
0 – 10	5.1	4.1	7.6	0.8	0.22	1.8	29
10 – 20	5.5	4.4	9.5	0.9	0.16	1.9	16
20 – 40	5.9	4.8	15.2	1.0	0.17	2.6	7

**Tabla 4.** Suelo LB2. Propiedades químicas-distribución en profundidad. Muestreo realizado previo a la aplicación de vinaza y fertilización.

Profundidad (cm)	pH (H <sub>2</sub> O)	pH (KCL)	Ca (mg Kg <sup>-1</sup> )	Na (mg Kg <sup>-1</sup> )	K (mg Kg <sup>-1</sup> )	Mg (mg Kg <sup>-1</sup> )	P (mg Kg <sup>-1</sup> )
0 – 10	5.0	4.0	10.2	0.9	0.58	2.9	26
10 – 20	5.2	4.1	11.3	0.9	0.39	3.0	27
20 – 40	5.2	6.9	14.0	1.1	0.33	3.1	11

El sitio L1, cuyo productor es Hugo Amorós, está ubicado en la Colonia Raúl Sendic sobre la ruta 3 (coordenadas: 30° 26' 59" latitud sur; 57° 39' 00" longitud oeste). El sitio LB2 se encuentra en la localidad de Bella Vista, en el empalme entre la ruta 3 y la ruta 30 (coordenadas: 30°19'0" latitud sur; 57°33'11" longitud oeste) y su productor es Luis Fernández.

Cada sitio se dividió en 3 bloques al azar que a su vez se subdividieron en cuatro parcelas. Cada parcela de cada bloque recibió un tratamiento diferente: control sin vinaza ni fertilizante, control con fertilizantes químicos o aplicación de diferentes dosis de vinaza (150 m<sup>3</sup>/ha o 300 m<sup>3</sup>/ha) (Figuras 4 y 5), cuya composición fue determinada previo a la aplicación (Tabla 5).

**Tabla 5.** Composición de vinaza promedio de las muestras correspondientes a los 2 sitios.

	kg m <sup>-3</sup>					
pH	N-total	P-total	K	Mg	Ca	Na
5,96	0,73	0,47	0,06	3,45	0,53	0,13

Bloque I	Bloque I	Bloque I	Bloque I	Bloque II	Bloque II	Bloque II	Bloque II	Bloque III	Bloque III	Bloque III	Bloque III
Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Parcela 4	Parcela 5	Parcela 6	Parcela 7	Parcela 8	Parcela 9	Parcela 10	Parcela 11	Parcela 12
Trat: 300	Trat: 150	Trat: F	Trat: C	Trat: 150	Trat: 300	Trat: C	Trat: F	Trat: 150	Trat: 300	Trat: F	Trat: C

Figura 4. Diseño experimental suelo L1: 0- Control, F- Fertilizante, 150- 150m<sup>3</sup>/ha vinaza, 300- 300m<sup>3</sup>/ha vinaza

Bloque III Parcela 9 Tratamiento: F	Bloque III Parcela 10 Tratamiento: 150	Bloque III Parcela 11 Tratamiento: 300	Bloque III Parcela 12 Tratamiento: C
Bloque II Parcela 5 Tratamiento: 300	Bloque II Parcela 6 Tratamiento: C	Bloque II Parcela 7 Tratamiento: F	Bloque II Parcela 8 Tratamiento: 150
Bloque I Parcela 1 Tratamiento: C	Bloque I Parcela 2 Tratamiento: F	Bloque I Parcela 3 Tratamiento: 150	Bloque I Parcela 4 Tratamiento: 300

Figura 5. Diseño experimental suelo LB2: C- Control, F- Fertilizante, 150- 150m<sup>3</sup>/ha vinaza, 300- 300m<sup>3</sup>/ha vinaza

## 2. Toma de muestras

La toma de muestras de suelo fue realizada por técnicos de ALUR utilizando calador de 2 cm de diámetro (0-10 cm de profundidad). Se tomaron muestras de todas las parcelas; cada muestra compuesta por 10 tomas de suelo al azar. Los muestreos se realizaron antes de la aplicación de vinaza y 28 días después de aplicada la misma. Para poder obtener condiciones óptimas de trabajo y ser homogeneizadas, la mayor parte de las muestras fueron secadas al aire a una temperatura de 20°C de manera de poder ser tamizadas utilizando una malla de 2 mm. Fracciones de las muestras se conservaron a 4°C y -80°C hasta el momento de su análisis por técnicas de cultivo o moleculares, respectivamente.

## 3. Determinación de Humedad

Se tomaron 10 g de cada muestra y se colocaron en estufa a 100°C por 48 horas, tras lo cual se volvió a medir el peso. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de humedad (H%) y el Factor de corrección de la humedad (h) de la siguiente manera (Frioni, 2006).

$$\text{H\%: } \text{H\%} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}} \times 100$$

Peso seco

$$\text{h: } \text{h} = \frac{100}{100 + \text{H\%}}$$

100

## 4. Cuantificación de bacterias por recuento en placa y por la técnica del número más probable (NMP)

A partir de una suspensión de 5 g de suelo en 45 mL de pirofosfato de sodio 0,1% (p/v) estéril que se agitó a 150 rpm durante 30 minutos, se realizaron diluciones seriadas en tubos de ensayo conteniendo la misma solución hasta llegar a una dilución final 10<sup>-6</sup>. A partir de esta dilución se llevaron a cabo los siguientes recuentos para determinar la abundancia de distintos grupos bacterianos.

**Bacterias heterótrofas**, se sembraron 10 µL en gota, por triplicado, de las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> en placas con medio Tryptic Soy Agar 1/10 Difco® (TSA 1/10) con el agregado de cicloheximida 100 µg/ml (ver Anexo). Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días realizándose un conteo primario de colonias a las 48 horas y luego a los 7 días. De este modo se pudo determinar la abundancia de heterótrofos aerobios en cada muestra (Smit et al., 2001).

***Pseudomonas fluorescentes***, se plaquearon 100  $\mu\text{L}$ , por duplicado, de las diluciones  $10^0$  y  $10^{-1}$  en placas con medio King's B (ver Anexo) suplementado con cicloheximida 100  $\mu\text{g/ml}$ , cloranfenicol 12,5  $\mu\text{g/ml}$  y ampicilina 50  $\mu\text{g/ml}$  para evitar el crecimiento de grupos microbianos no deseados. Las placas se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  durante 48 horas y se contaron las colonias fluorescentes bajo luz ultravioleta (King et al., 1954).

***Bacillus spp.***, se plaquearon 100  $\mu\text{L}$ , por duplicado, de las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en placas con medio TSA 1/10 (Smit et al., 2001) luego de incubar las diluciones de suelo a  $85^\circ\text{C}$  por 30 min para eliminar las células vegetativas. Las placas se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  durante 48 horas y se contaron todas las colonias (originadas a partir de esporas).

**Fijadores de nitrógeno**, se sembró por inclusión 1 mL por duplicado, de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en placas con medio Nfb sólido con cicloheximida 100  $\mu\text{g/ml}$  (Döbereiner 1980, ver Anexo). Se agregó una sobrecapa de agar-agua 2% con cicloheximida 100  $\mu\text{g/ml}$  para disminuir la difusión de oxígeno en el medio. Las placas se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  durante 7 días y se contaron todas las colonias crecidas.

**Solubilizadores de fosfato**, se plaquearon 100  $\mu\text{L}$ , por duplicado, de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en placas con medio NBRIP sólido (Nautiyal 1999, ver Anexo). Las placas se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  durante 7 días y se contaron las colonias que generaron halo de solubilización de la fuente de fósforo insoluble.

**Actinobacterias**, se utilizaron placas conteniendo el medio Starch Casein Agar (SCA, ver Anexo) suplementado con cicloheximida 100  $\mu\text{L/mL}$  para inhibir el crecimiento fúngico. Se plaquearon en superficie 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  por duplicado y las placas fueron incubadas a  $25^\circ\text{C}$  durante 7 días. El recuento de colonias características se realizó luego de remover las colonias que no estuvieran adheridas al medio de cultivo utilizando un algodón húmedo (Leoni y Ghini, 2003).

**Amonificantes**, se utilizó la técnica del número más probable (NMP). Se inocularon, por triplicado, tubos conteniendo medio líquido con peptona al 4% con 100  $\mu\text{L}$  de 3 diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . La incubación se llevó a cabo a  $25^\circ\text{C}$ , con agitación a 150 rpm durante 48 horas. La detección de este grupo de bacterias se realizó mediante un revelado colorimétrico utilizando el reactivo de Nessler (Seeley et al., 1991). Para ello se colocó una gota de cultivo y una gota de reactivo: si la reacción revela un color naranja a rojizo indica que hay presencia de bacterias amonificantes mientras que si el color de la reacción resulta amarillo indica ausencia de las mismas (Seeley et al., 1991).

## 5. Actividad Microbiana

Se midió la actividad microbiana por respirometría incubando 25 g de suelo a 25°C por 48h en frascos herméticamente cerrados, con un previo ajuste de la humedad al 75% de la capacidad de campo. Para ello se determinó la concentración de CO<sub>2</sub> por cromatografía de gases utilizando el cromatógrafo de gases SRI 310C (SRI instruments), a partir de un volumen de inyección de 1 mL. El detector operó a 40°C y 120 mA, la temperatura de la columna fue 40°C, y el gas portador utilizado fue helio (He) a 40 mL/min (Sparling y West, 1990).

## 6. Extracción de ADN

Se obtuvo ADN de cada muestra a partir de 0,25 g de suelo (conservado a -80°C hasta su uso) utilizando el PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio). El ADN extraído de las muestras se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8% (p/v) con buffer TAE (Buffer Tris-acetato-EDTA) 1X, a 80 V durante 1 h. La concentración del ADN y su pureza se determinó mediante espectrofotometría con un Thermo Scientific Nanodrop 1000 Spectrophotometer a partir de 1 µL de muestra (Sparling y West, 1990).

## 7. PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)

A partir del ADN total extraído de las muestras de suelo se realizaron reacciones de PCR utilizando la Ranger mix (Bioline) y cebadores con adaptadores y barcodes dirigidos a la región V4 del gen ARNr 16S del dominio *Bacteria* (ver Anexo con las secuencias). De este modo se obtuvieron amplicones de aproximadamente 400 pares de bases.

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y se aisló la banda de interés utilizando el kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Milani et al., 2013).

## 8. Secuenciación masiva

Los amplicones conteniendo las secuencias adaptadoras y barcodes, se cuantificaron usando el fluorímetro Qubit® con el kit High Sensitivity double stranded DNA (Thermo Scientific). Una vez cuantificados, personal del Laboratorio de Genómica diluyó a una concentración adecuada para ser clonalmente amplificados en una PCR en emulsión en el sistema de

termociclado Ion OneTouch™ 2 con el kit Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Thermo Scientific). Los amplicones fueron posteriormente secuenciados en el sistema Ion PGM™ con el kit Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit, en un Ion 316™Chip v2 (Thermo Scientific). Las lecturas obtenidas fueron procesadas en el servidor asociado al secuenciador, generando un archivo fastq para cada muestra conteniendo información sobre cada lectura (nombre, secuencia, calidad).

En el presente trabajo se utilizó el protocolo y las herramientas de QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2010), para obtener la diversidad alfa, la diversidad beta así como también el porcentaje de abundancia relativa de filo para cada una de las muestras, previo a la aplicación de los tratamientos (fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup>/ha y 300m<sup>3</sup>/ha) y un mes pasado la aplicación de los mismos. Durante el análisis se asignaron las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) utilizando la filogenia de referencia de Greengene con una identidad del 97% (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>).

## **9. Análisis de datos**

Los datos obtenidos de los recuentos bacterianos y respirometría fueron convertidos según el porcentaje de humedad de cada muestra para poder expresarse por gramo de suelo seco (Frioni, 2006). Estos valores fueron transformados a log<sub>10</sub> (excepto el de respirometría) y analizados utilizando el programa Statistica 5.0. Se examinó la normalidad de los datos por el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett. En los casos donde la distribución de los datos fue normal y las varianzas homogéneas, se evaluaron para cada variable (abundancia de los grupos de microorganismos y actividad microbiana) las diferencias entre los tratamientos mediante ANOVA de una vía (con tratamiento como factor) y el test de Tukey's HSD (Honestly Significant Difference). De lo contrario, se realizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Mann-Whitney.

# Resultados

## 1. Abundancia de bacterias en suelos con y sin vinaza.

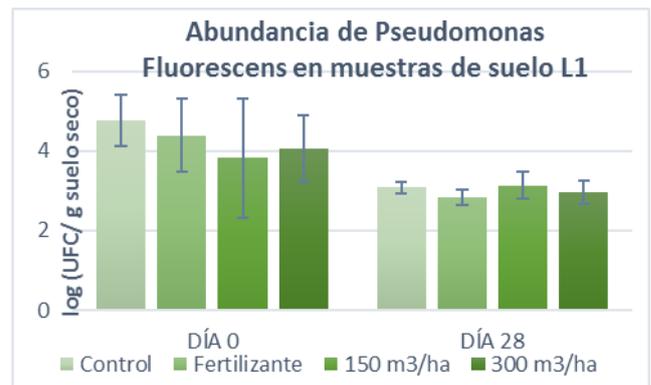
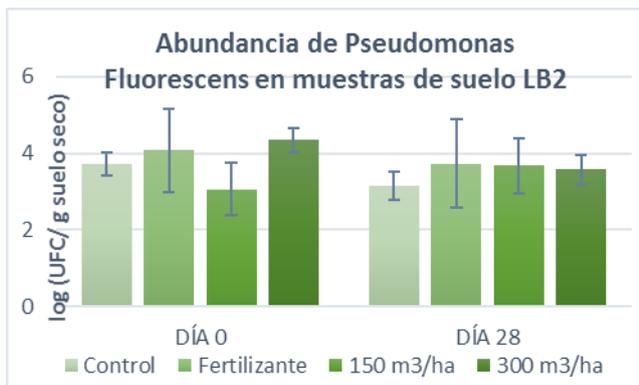
Se analizaron las poblaciones cultivables de bacterias heterótrofas, actinobacterias, bacterias solubilizadoras de fosfato, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* fluorescentes y bacterias fijadoras de nitrógeno mediante la técnica de recuento en placa.

Los recuentos se llevaron a cabo a partir de muestras de suelo provenientes de dos ensayos instalados en suelos diferentes (L1 y LB2), contrastantes física y químicamente, representativos de la zona por su extensa distribución. Las mismas fueron tomadas previo al riego con vinaza y 28 días luego de la aplicación de la misma. Los ensayos corresponden a distintos tratamientos: control, fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup>/ha y vinaza 300m<sup>3</sup>/ha. En todos los casos se llevó a cabo el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco (UFC/g).

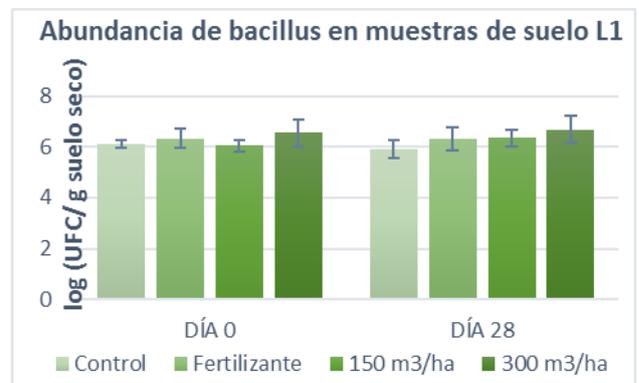
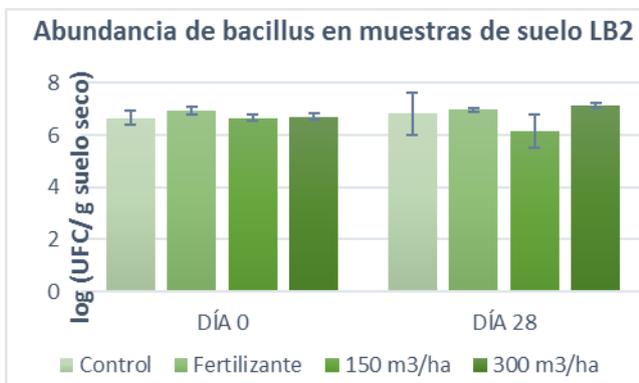
El número de heterótrofos totales se ubicó en el orden de 10<sup>7</sup> UFC/g de suelo seco, el de *Pseudomonas* fluorescentes entre 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> UFC/g, observándose una disminución de la abundancia para el suelo L1 a los 28 días. Las poblaciones de *Bacillus* spp., de bacterias fijadoras de nitrógeno y de actinobacterias se ubicaron en el orden de 10<sup>6</sup> UFC/g, mientras que la abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfato se ubicó en el orden de 10<sup>5</sup> UFC/g. No se constataron en ninguno de los grupos diferencias significativas entre tratamientos en los distintos tiempos respecto al control sin agregado de vinaza (figuras 6-11).



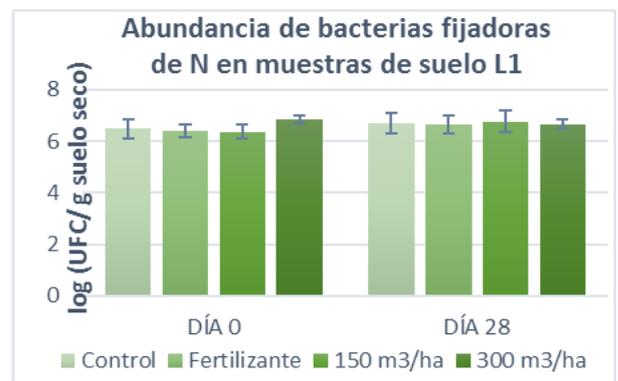
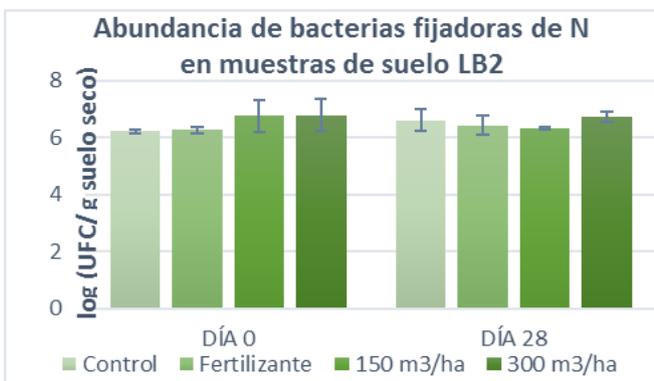
**Figura 6.** Valores medios de 3 repeticiones de abundancia de bacterias heterótrofas expresados en logaritmo de UFC/g de suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas entre tratamientos del mismo sitio, control sin vinaza, fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup> y vinaza 300m<sup>3</sup> (Datos en Anexo: Abundancia).



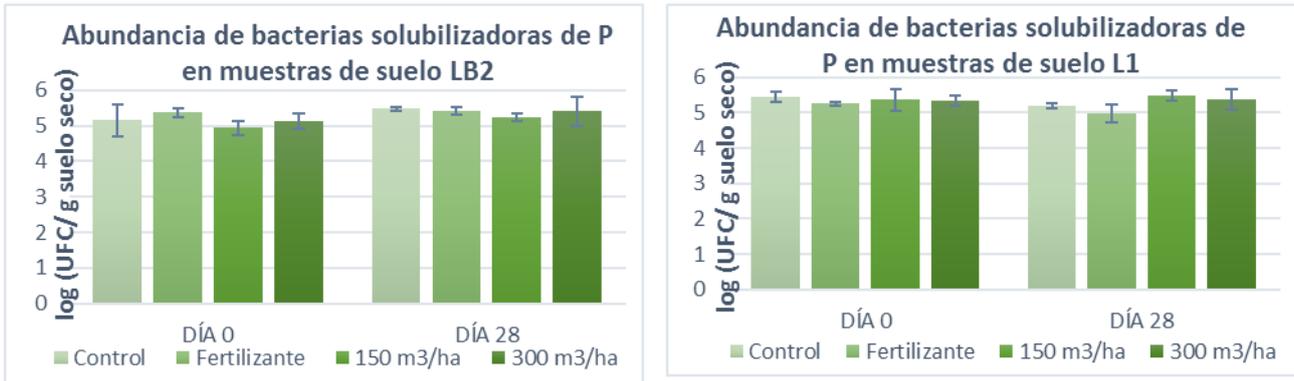
**Figura 7.** Valores medios de 3 repeticiones de abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes expresados en logaritmo de UFC/g de suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas entre tratamientos del mismo sitio, control sin vinaza, fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup> y vinaza 300m<sup>3</sup> (Datos en Anexo: Abundancia).



**Figura 8.** Valores medios de 3 repeticiones de abundancia de *Bacillus* spp. expresados en logaritmo de UFC/g de suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas entre tratamientos del mismo sitio, control sin vinaza, fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup> y vinaza 300m<sup>3</sup>. (Datos en Anexo: Abundancia).



**Figura 9.** Valores medios de 3 repeticiones de abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno expresados en logaritmo de UFC/g de suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas entre tratamientos del mismo sitio, control sin vinaza, fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup> y vinaza 300m<sup>3</sup>. (Datos en Anexo: Abundancia).

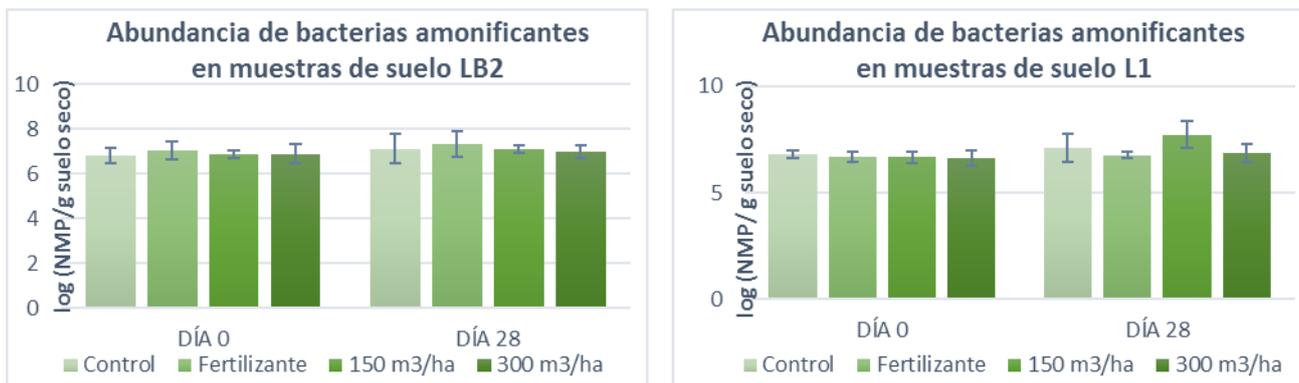


**Figura 10.** Valores medios de 3 repeticiones de abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfato expresados en logaritmo de UFC/g de suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas entre tratamientos del mismo sitio, control sin vinaza, fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup> y vinaza 300m<sup>3</sup> (Datos en Anexo: Abundancia).



**Figura 11.** Valores medios de 3 repeticiones de abundancia de actinobacterias expresados en logaritmo de UFC/g de suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas entre tratamientos del mismo sitio, control sin vinaza, fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup> y vinaza 300m<sup>3</sup> (Datos en Anexo: Abundancia).

Para estudiar la abundancia de las bacterias amonificantes se utilizó la técnica del número más probable (NMP). Se analizaron muestras de suelo provenientes de los dos sitios en estudio, previo a al riego con vinaza y 28 días luego de aplicada la misma. Las muestras analizadas corresponden a distintos tratamientos: control, fertilizante químico, vinaza 150 m<sup>3</sup>/ha y vinaza 300 m<sup>3</sup>/ha. El número de bacterias amonificantes se ubicó en el orden de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> NMP/g, no constatándose en ningún momento de muestreo diferencias significativas de los tratamientos respecto al control (Figura 12).

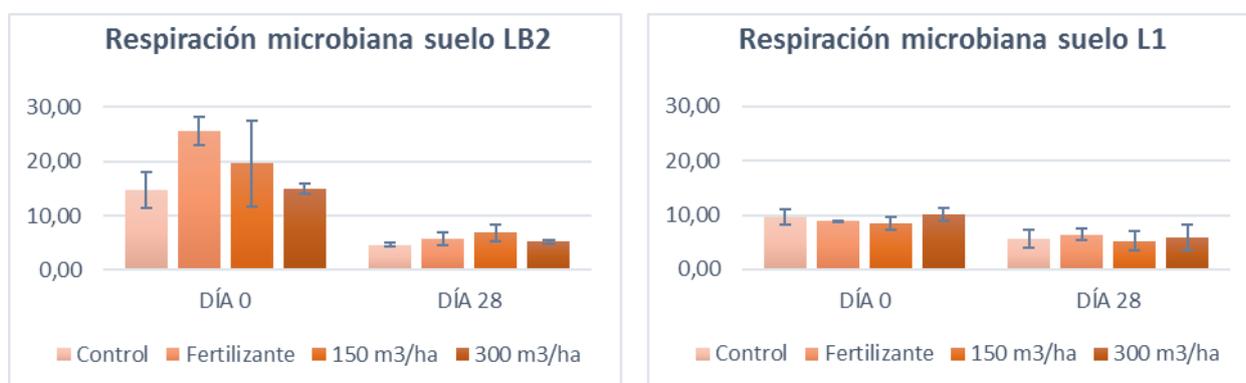


**Figura 12.** Valores medios de 3 repeticiones de abundancia de bacterias amonificantes expresados en logaritmo de UFC/g de suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas entre tratamientos del mismo sitio, control sin vinaza, fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup> y vinaza 300m<sup>3</sup> (Datos en Anexo: Abundancia).

## 2. Actividad microbiana

Se midió la actividad microbiana mediante la técnica de respirometría a partir de las muestras de suelo tomadas en las distintas parcelas que fueron tratadas diferencialmente (control, fertilizante químico, vinaza 150 m<sup>3</sup>/ha, vinaza 300 m<sup>3</sup>/ha); la medida se llevó a cabo previo a la aplicación de los tratamientos y pasados 28 días.

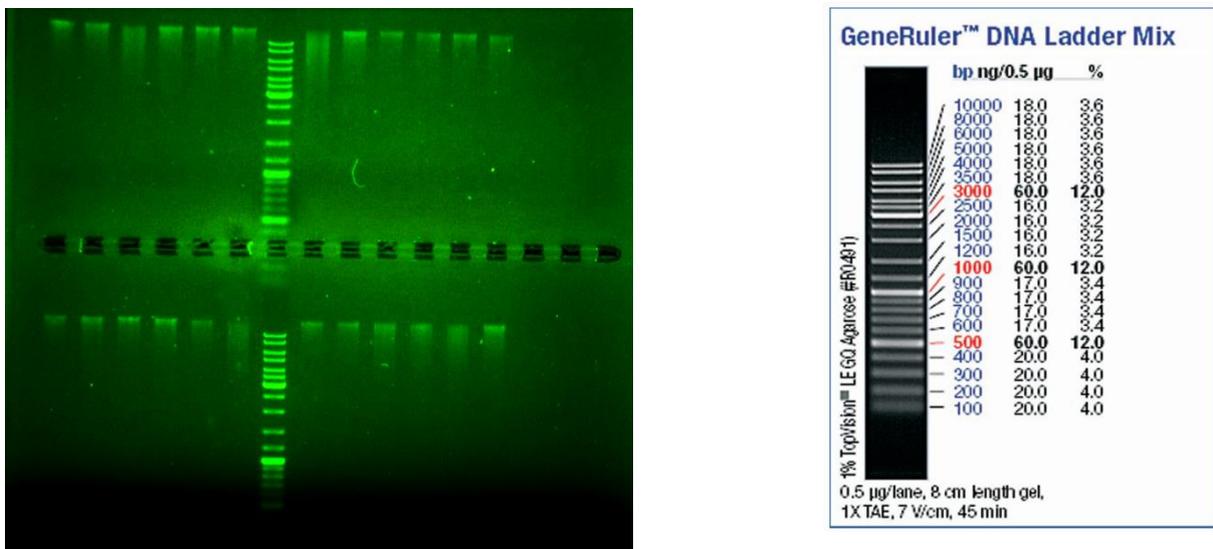
La producción de CO<sub>2</sub> es un dato que revela directamente la respiración de los microorganismos presentes en la muestra de suelo y permite determinar la actividad metabólica de los mismos. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos tanto en el sitio L1 como en el LB2 (Figura 13). Se puede apreciar, en ambos sitios de estudio, una disminución en la actividad microbiana con el paso del tiempo para todos los tratamientos, incluida la parcela de control.



**Figura 13.** Gráfico de respiración microbiana en suelo L1 y LB2 antes y 28 días después de la aplicación de fertilizante químico y vinaza (150m<sup>3</sup> y 300m<sup>3</sup>) (Datos en Anexo: Respirometría)

### 3. Estudio de la estructura de la comunidad bacteriana

Utilizando técnicas de biología molecular (independientes de cultivo) se llevó a cabo el análisis de la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana presente en los suelos en estudio. En primer lugar se extrajo el ADN total a partir de 0,25 g de suelo utilizando el PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio). Para asegurar una correcta extracción se visualizó por electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v) con buffer TAE (Buffer Tris-acetato-EDTA) 1X, a 80 V durante 1 h (Figura 14), y se midió su concentración y pureza por espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Tabla 6). A partir de los valores obtenidos se realizaron las diluciones necesarias para llevar a cabo posteriormente las reacciones de PCR.



**Figura 14. Izquierda:** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (p/v) de muestras de ADN obtenidas a partir de suelos con y sin tratamiento (control, fertilizante químico y vinaza). Como marcador de peso molecular se utilizó el Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

**Derecha:** Referencia de peso de las bandas del Marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo scientific product information , 2018).

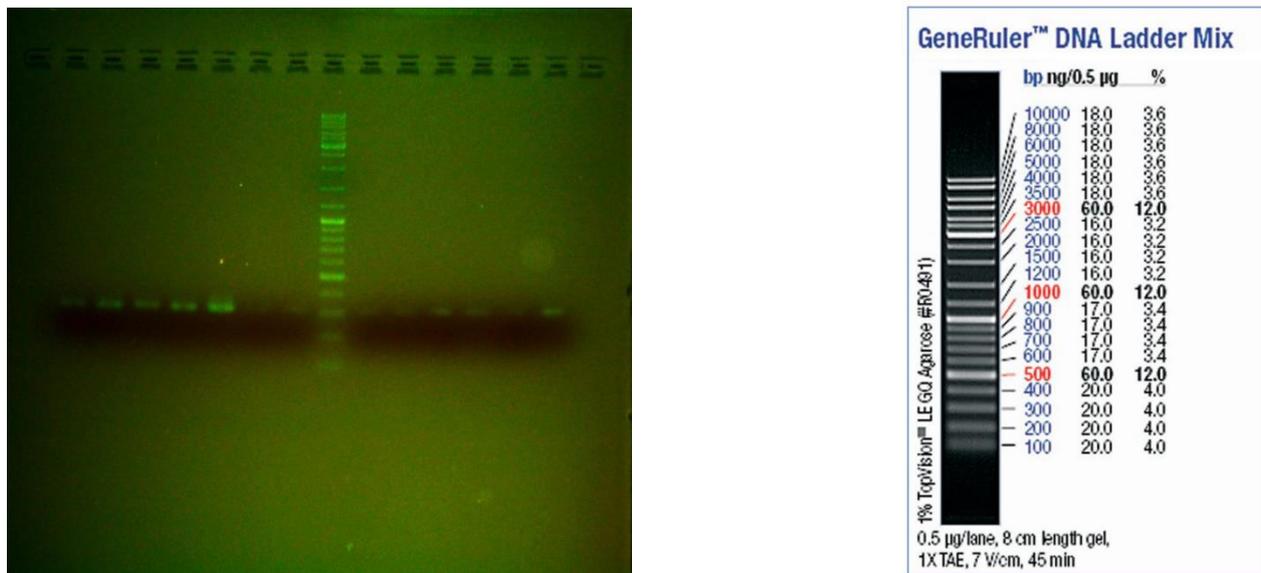
**Tabla 6.** Concentración y medida de la absorbancia 260/280 de muestras de extracción de ADN total de ambos suelos en los dos tiempos de muestreo utilizando Nanodrop.

Tiempo 0 Suelo LB2			Tiempo 0 Suelo L1		
Tratamiento	[ ] ng/ $\mu$ L	ABS 260/280	Tratamiento	[ ] ng/ $\mu$ L	ABS 260/280
Control	8,10	1,58	Control	5,70	2,07
Fertilizante	10,87	1,68	Fertilizante	8,43	1,79
Vinaza 150m <sup>3</sup> /ha	13,50	1,82	Vinaza 150m <sup>3</sup> /ha	17,27	1,84
Vinaza 300m <sup>3</sup> /ha	17,47	1,98	Vinaza 300m <sup>3</sup> /ha	16,17	1,91

Tiempo 28 días Suelo LB2			Tiempo 28 días Suelo L1		
Tratamiento	[ ] ng/ $\mu$ L	ABS 260/280	Tratamiento	[ ] ng/ $\mu$ L	ABS 260/280
Control	10,87	1,92	Control	7,67	1,68
Fertilizante	9,23	1,94	Fertilizante	6,93	1,77
Vinaza 150m <sup>3</sup> /ha	11,73	1,86	Vinaza 150m <sup>3</sup> /ha	7,53	1,88
Vinaza 300m <sup>3</sup> /ha	7,43	1,93	Vinaza 300m <sup>3</sup> /ha	9,87	1,91

A partir de las diluciones del ADN extraído se llevaron a cabo reacciones de PCR para obtener amplicones de un fragmento del gen ARNr 16S utilizando primers con adaptadores y barcodes dirigidos a la región V4 del gen para el dominio *Bacteria*. El fragmento de interés de aproximadamente 400 pares de bases fue recuperado llevando a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) y posterior purificación de banda con kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Epigenetics company) (Figura 15).



**Figura 15. Izquierda:** Electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) de purificación de banda de algunas reacciones de PCR. Como marcador de peso molecular se utilizó el Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

**Derecha:** Referencia de peso de las bandas del Marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo scientific, product information , 2018).

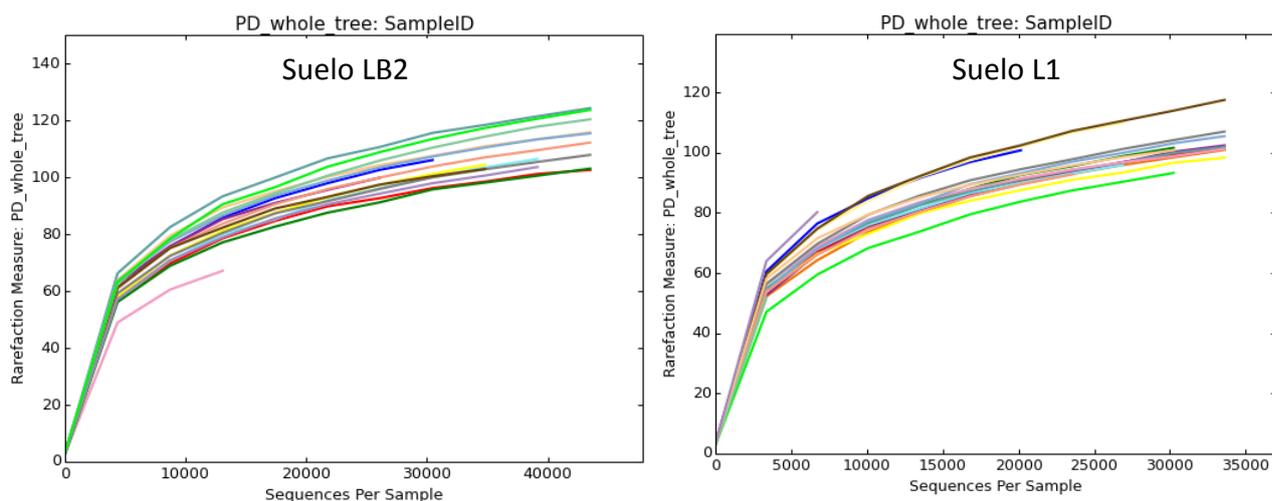
Los amplicones conteniendo las secuencias adaptadoras y barcodes se enviaron al Servicio de Secuenciación del IIBCE donde fueron cuantificados en el fluorímetro Qubit®. Una vez cuantificados, se diluyeron a una concentración adecuada para ser clonalmente amplificados en una PCR en emulsión en el sistema de termociclado Ion OneTouch™ 2. Los amplicones fueron posteriormente secuenciados en el sistema Ion PGMTM con el kit Ion PGMTM Hi-Q™ Sequencing Kit, en un Ion 316™ Chip v2 (Thermo Scientific). Las lecturas obtenidas fueron procesadas en el servidor asociado al secuenciador, generando un archivo.fastq para cada muestra, a partir de los cuales se llevó a cabo un análisis de la secuenciación masiva.

### 3.1 Análisis de la comunidad bacteriana por secuenciación masiva

Durante la secuenciación masiva de las muestras del suelo L1 se obtuvieron 2.145.959 lecturas (secuencias), de las cuales 987.141 pudieron ser utilizados durante el análisis de la secuenciación. El promedio del largo de las lecturas obtenidas fue de 195 pb, mientras que el rango obtenido por muestra para dicho parámetro varió entre 180 pb y 205 pb.

Para el suelo LB2 se obtuvieron 4.221.748 lecturas, y fueron utilizadas de las mismos para el análisis 2.195.309. El promedio del largo de las lecturas obtenidas fue de 176 pb mientras que el rango obtenido por muestra para dicho parámetro varió entre 175 pb y 186 pb.

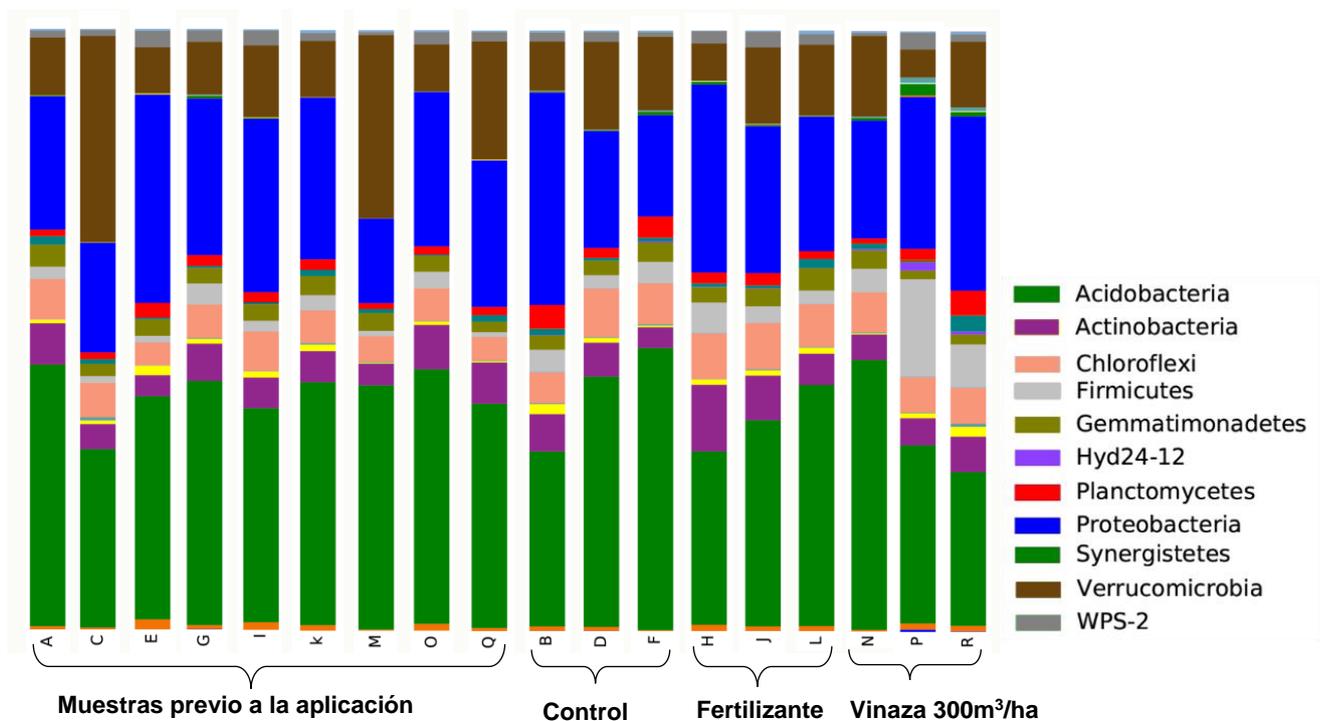
Se llevó a cabo un análisis utilizando el protocolo y las herramientas de QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2010). Por medio del script “split\_libraries.py” las secuencias fueron asignadas a las muestras de suelo según las secuencias de sus barcodes. En este mismo paso se eliminaron las secuencias correspondientes a los primers, barcodes y adaptadores permaneciendo únicamente la secuencia de interés. Manteniendo un mínimo de secuencia de 195 pares de bases (pb), que coincide con el largo medio de los reads obtenidos durante la secuenciación, y un máximo de secuencia de 280 pb, largo esperado luego de remover secuencias no deseadas. En el siguiente paso se detectaron las quimeras y fueron filtradas mediante los scripts “identify\_chimeric\_seqs.py y filter\_fasta.py”, utilizando solamente el algoritmo de búsqueda del software USEARCH 6.1 y no una base de datos de quimeras propia. Mediante el uso del script “pick\_closed\_reference\_otus.py” y la base de datos greengene (Lan et al., 2012) se asignaron taxonómicamente las OTU’s en forma representativa con un 97% de identidad de las secuencias, y se construyeron tanto el árbol filogenético como la tabla de OTU’s que fueron utilizados en pasos siguientes del análisis. Mediante el script “pick\_rep\_set.py” se aislaron cada una de las secuencias asociadas a cada OTU, con las cuales se trabajó por el resto del protocolo. Finalmente, con todo lo obtenido en pasos anteriores se construyeron los gráficos de abundancia, de alfa y beta rarefacción, de los diferentes taxones por muestra a través de los scripts “summarize\_taxa\_through\_plots.py”, “alpha\_rarefaction.py” y “beta\_diversity\_through\_plots.py”, respectivamente.



**Figura 16.** Gráficos de alfa rarefacción obtenidos a partir del análisis de secuenciación masiva de ambos suelos. Se observan las muestras por triplicado para los tratamientos control, fertilizante, vinaza 300m<sup>3</sup> para tiempo cero y 28 días.

En las curvas de alfa rarefacción (Figura 16) se describe la variación de la diversidad de las muestras analizadas con respecto al número de secuencias o lecturas obtenidas por muestra. Para todas las muestras, tanto para las analizadas en el suelo L1 como en el suelo LB2, se observó el inicio de una meseta en la gráfica.

Los distintos gráficos de porcentaje de abundancia se construyeron según taxonomía a distintos niveles, de los cuales se decidió exponer la abundancia por phylum y por clase. Para el suelo L1 los phyla de mayor abundancia fueron Acidobacteria (37,2%), Proteobacteria (24,7%), Verrucomicrobia (13%), Chloroflexi (6,0%), Actinobacteria (5,7%), Firmicutes (3,5%), Gemmatimonadetes (2,6%) y Planctomycetes (1,9%). En alguna de las muestras que recibieron el tratamiento de vinaza de 300 m<sup>3</sup>/ha se observó la presencia de los phyla Syner-

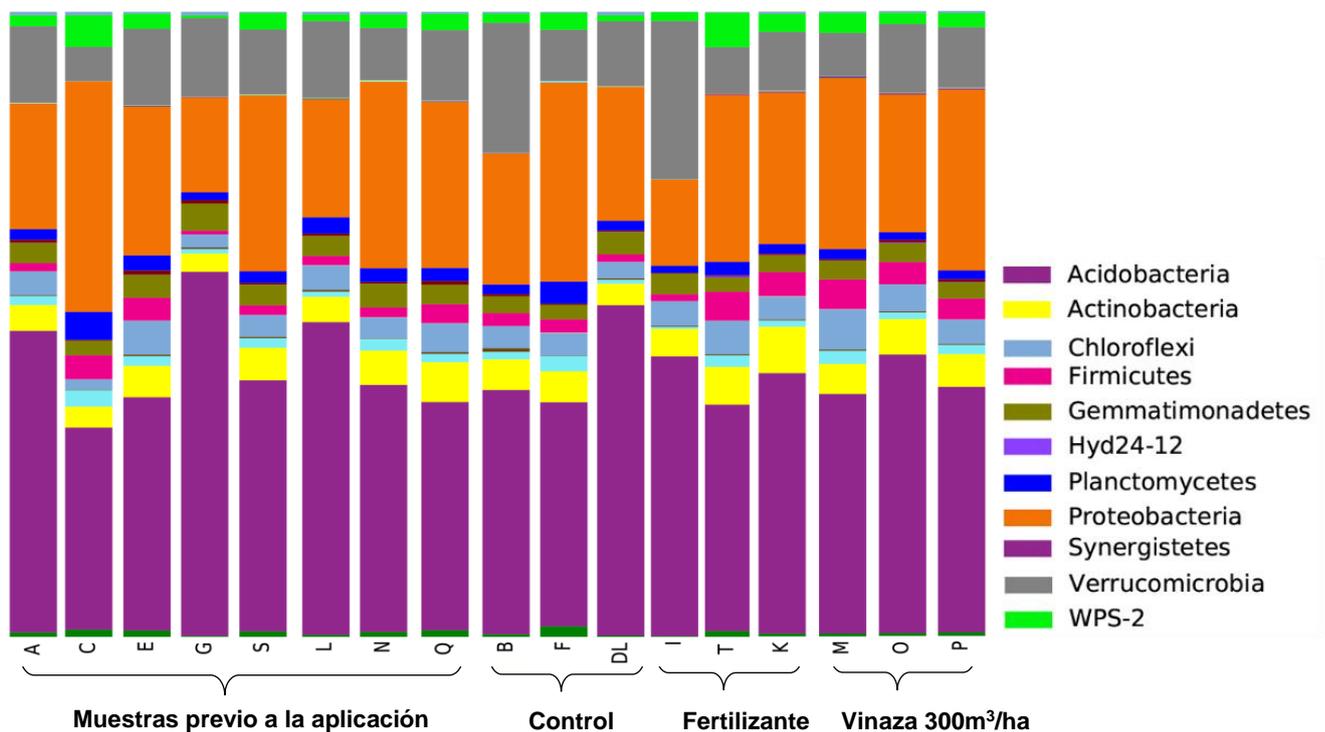


**Figura 17.** Gráfico de abundancia (%) según phylum en muestras del suelo L1. Se observan las abundancias relativas en las muestras por triplicado para los tratamientos control, fertilizante y vinaza 300m<sup>3</sup>/ha.

gistetes, Hyd 24-12, así como un aumento considerable en la abundancia de Firmicutes (Figura 17).

En el caso del suelo LB2 los phyla de mayor abundancia fueron Acidobacteria (42%), Proteobacteria (24,5%), Verrucomicrobia (11,4%), Actinobacteria (4,9 %), Chloroflexi (3,8%), Gemmatimonadetes (3,1%), Firmicutes (2,6%), Wps-2 (2,4%) y Planctomycetes (2%) (Figura 18).

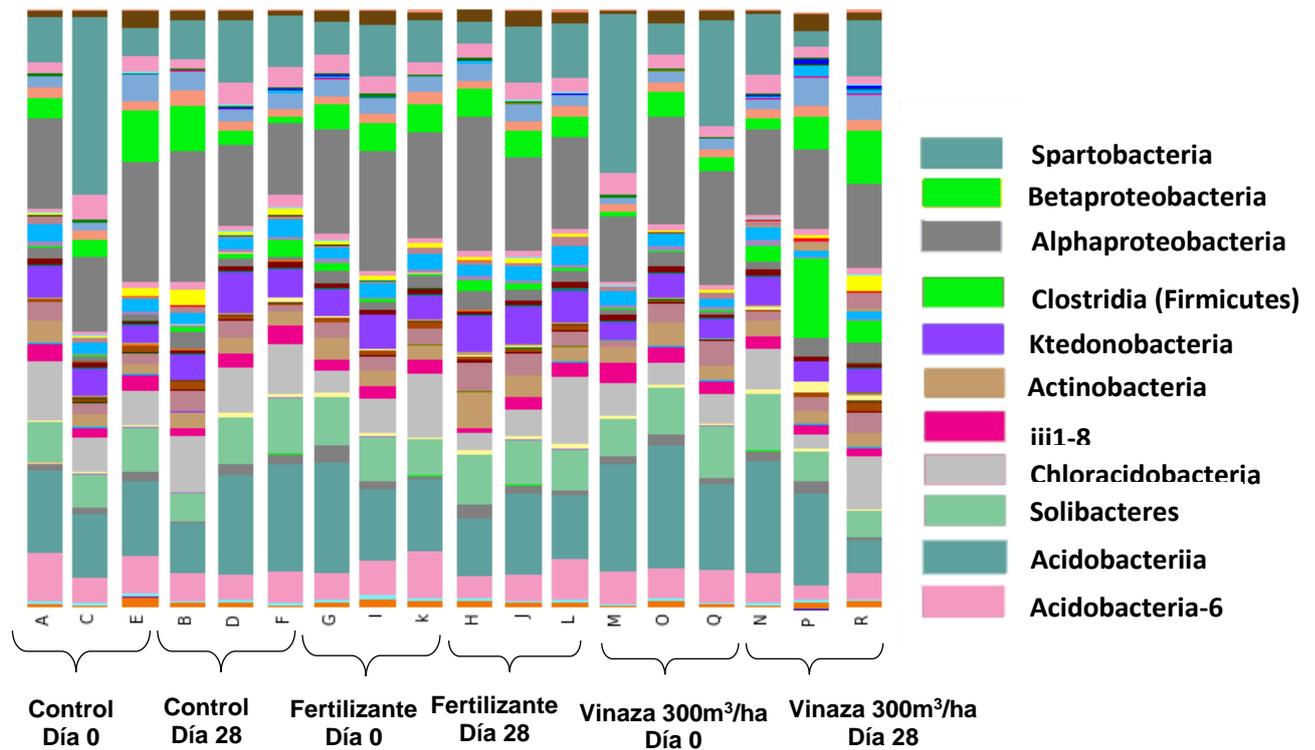
En cuanto a la abundancia de clases presentes en el suelo L1, los porcentajes mayores que se encontraron fueron Alphaproteobacteria (16,3%), Acidobacteriia (13,8%), Spartobacteria (10,1%), Solibacters (7,0%), Chloracidobacteria (6,5%), Acidobacteria-6 (5,2%), Ktedonobacteria (4,5%), Betaproteobacteria (4,2%), Actinobacteria (2,8%), Thermoleophilia (2,6%), Gammaproteobacteria (2,6%), Pedosphaerae (2,6%).



**Figura 18.** Gráfico de abundancia (%) según phylum en muestras del suelo LB2. Se observan las abundancias relativas en las muestras por triplicado para los tratamientos control, fertilizante, vinaza 300m<sup>3</sup>/ha.

Se puede observar al comparar los perfiles obtenidos para los sitios tratados con vinaza que luego de la aplicación existió un aumento importante de la clase Clostridia, perteneciente al phylum Firmicutes que pasó de un porcentaje de abundancia de 0,3% a 6,5%, así como también una disminución de las clases Acidobacteriia y Spartobacteria. Al observar el resto de los tratamientos vemos que la disminución en la clase Spartobacteria se da en todos los sitios de muestreo al pasar 1 mes, mientras que el grupo Acidobacteriia presenta una gran variabilidad en todas las muestras y por lo tanto no se puede afirmar que dicha disminución

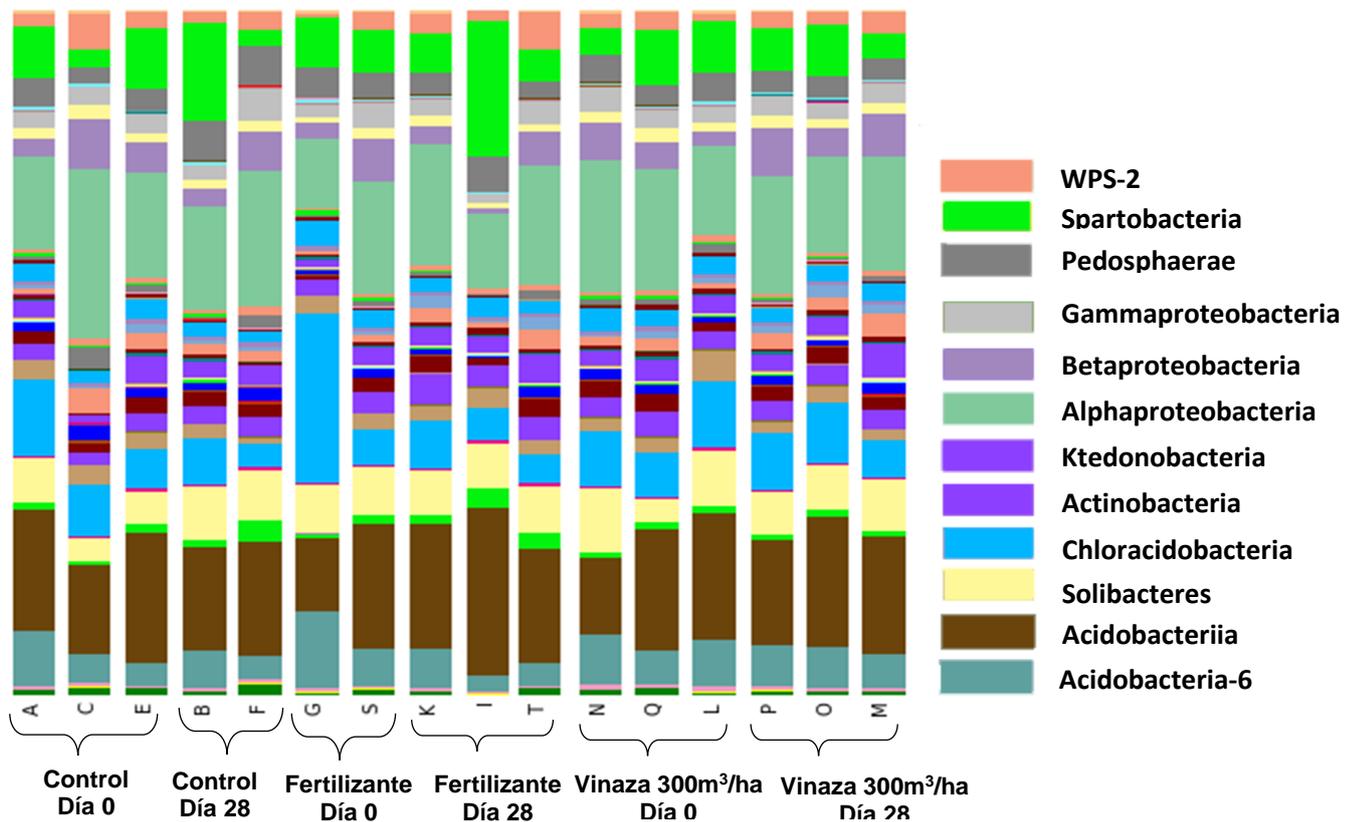
sea consecuencia de la aplicación de vinaza, mientras que el aumento de la clase Clostridia solamente ocurre una vez pasado un mes del tratamiento con vinaza (Figura 19).



**Figura 19.** Gráfico de abundancia (%) según Clases en muestras del suelo L1. Se observan las abundancias relativas en las muestras por triplicado para los tratamientos control, fertilizante, vinaza 300m<sup>3</sup>/ha.

Para el suelo LB2, los porcentajes de abundancia de clases mayores que se encontraron fueron Acidobacteriia (16,9%), Alphaproteobacteria (16,3%), Chloracidobacteria (8,0%), Spartobacteria (7,1%), Solibacters (6,8%), Acidobacteria-6 (5,7%), Betaproteobacteria (4,1%), Pedosphaerae (3,9%), WPS-2 (2,4%), Actinobacteria (2,9%), Gammaproteobacteria (2,7%), Ktedonobacteria (2,6%), iii1-8 (2,3%).

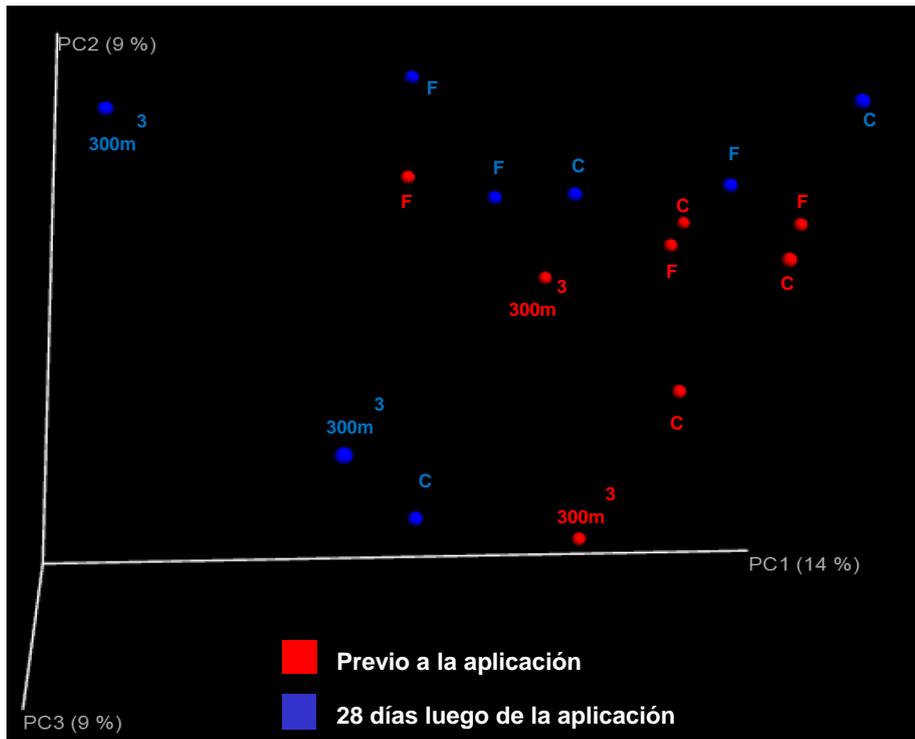
Observando los perfiles de abundancia de clases para los distintos tratamientos, no se observan diferencias entre las distintas muestras pasado un mes (Figura 20).



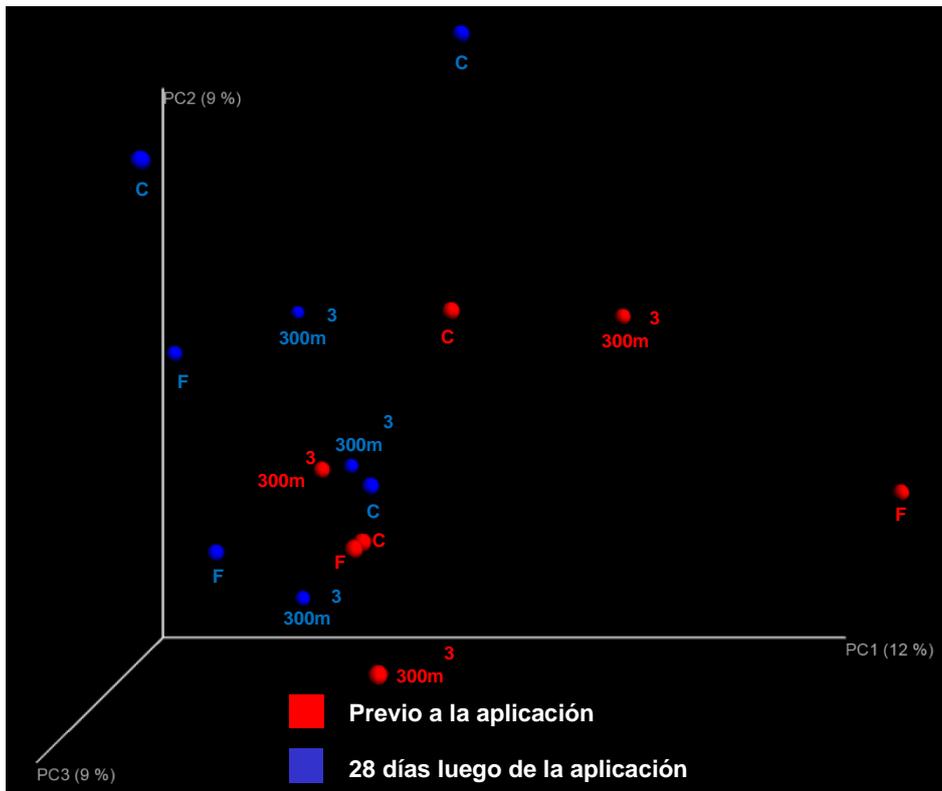
**Figura 20.** Gráfico de abundancia (%) según Clases en muestras del suelo LB2. Se observan las abundancias relativas en las muestras por triplicado para los tratamientos control, fertilizante, vinaza 300m<sup>3</sup>/ha.

Para determinar la existencia de diferencias en la composición de la comunidad bacteriana para cada una de las muestras se llevó a cabo el análisis unweighted UniFrac, el cual calcula la distancia entre comunidades basándose en información filogenética, tomando en cuenta el árbol filogenético y la  $\beta$ -diversidad combinadas con el análisis estadístico análisis de coordenadas principales (PCoA) (Lozupone y Knight, 2005; Lozupone et al., 2006).

En ambos suelos se observó que no existieron agrupaciones según los tratamientos indicando una alta variabilidad entre las distintas réplicas del mismo tratamiento (Figuras 21 y 22). De la misma forma se pudo observar la variabilidad intrínseca de las comunidades bacterianas en ambos suelos donde no se detectaron agrupaciones previas al tratamiento.



**Figura 21.** Análisis de PCoA de  $\beta$ -diversidad, unweighted UniFrac sitio L1. Se observan las distancias filogenéticas entre las muestras por triplicado para los tratamientos control (C), fertilizante (F) y vinaza 300m<sup>3</sup>/ha (300m<sup>3</sup>).



**Figura 22.** Análisis de PCoA de  $\beta$ -diversidad, unweighted UniFrac sitio LB2. Se observan las distancias filogenéticas entre las muestras por triplicado para los tratamientos control (C), fertilizante (F) y vinaza 300m<sup>3</sup>/ha (300m<sup>3</sup>).

## DISCUSIÓN

El estudio de la abundancia y diversidad de los microorganismos que conforman las comunidades microbianas del suelo es de vital importancia para determinar los efectos del uso de los diferentes fertilizantes (Thwaites, 2011), y por tanto de la vinaza. Los estudios de corta duración aportan al entendimiento del uso de distintos productos sobre la microbiota del suelo. Aun así, existe desinformación acerca del uso de fertilizantes y correctas prácticas de agricultura sobre las propiedades microbiológicas en suelos destinados al cultivo de caña de azúcar (Navarrete et al., 2015). Es por ello que en el presente trabajo se llevaron a cabo estudios de la abundancia microbiana utilizando la técnica de recuento en placa, determinando la actividad microbiana mediante respirometría usando cromatografía gaseosa, y el estudio de la diversidad y estructura de la comunidad microbiana por secuenciación masiva.

### 1. Abundancia de bacterias cultivables en suelos con y sin vinaza

En este trabajo se determinó la abundancia de varios grupos microbianos mediante recuento en placa, a partir de muestras de suelos de composición contrastante (suelos L1 y LB2) antes y después de ser tratados con vinaza en diferentes concentraciones (150m<sup>3</sup>/ha, 300m<sup>3</sup>/ha), obteniendo así una mayor información acerca de las comunidades microbianas presentes en suelos tratados con vinaza en el Uruguay. Los grupos microbianos estudiados por este método fueron bacterias heterótrofas totales, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp, bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias solubilizadoras de fosfato y actinobacterias. A partir de las mismas muestras se determinó también la abundancia de bacterias amonificantes utilizando la técnica de número más probable (NMP).

La abundancia de bacterias heterótrofas totales previo a los tratamientos con vinaza se ubicó en el orden de 10<sup>7</sup> UFC/g suelo seco tanto para el suelo L1 como para el suelo LB2. Estudios anteriores de abundancia de heterótrofos revelan valores promedio de 8x10<sup>8</sup> UFC/g de suelos cultivados con caña de azúcar en la India (Shukla et al., 2008) mientras que en suelos de Uruguay, se reportaron en pradera valores promedio de 2,5 x 10<sup>7</sup> UFC/g suelo seco (Bajsa, 2008), y en suelos de productores de caña de azúcar en Bella Unión valores de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> UFC/g suelo seco (Fernández, 2012; Senatore, 2013). El recuento de unidades formadoras de colonias para *Pseudomonas* fluorescentes previo a los tratamientos, se ubicó en el orden de 10<sup>3</sup>- 10<sup>4</sup> UFC/g suelo seco, tanto para el suelo L1 como para el suelo LB2. En estudios anteriores realizados en suelos de territorio uruguayo, se obtuvieron valores de 10<sup>5</sup> en mues-

tras de pradera (Bajsa, 2008) y  $10^3$ - $10^6$  en suelos de rotaciones agrícola-ganaderas de Uruguay (Bajsa, 2015), mientras que en suelos de praderas de Holanda se encontraron resultados de  $10^5$  (van Elsas et al., 2002) siendo estos un poco más elevados a los obtenidos en este trabajo. En muestras de suelo agrícola argentino, se obtuvieron valores de  $10^4$  que son coincidentes con los obtenidos en el presente trabajo (Agaras et al., 2012).

El número de UFC/g suelo seco obtenido previo a los tratamientos para *Bacillus* spp, se ubicó en el orden de  $10^6$  UFC/g suelo seco para ambos suelos en estudio. Este dato coincide con lo obtenido en suelos de pradera de Uruguay (Bajsa, 2008). La abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno previo a los tratamientos se ubicó en el orden de  $10^6$  UFC/g suelo seco para ambos tipos de suelo. En estudios de suelos de la India (Shukla et al., 2008) se observan abundancias de fijadoras de nitrógeno de  $10^4$ - $10^5$  UFC/g suelo, estos valores son menores a lo obtenido en las distintas muestras de suelo de este trabajo.

La abundancia obtenida previo a los tratamientos para bacterias solubilizadoras de fosfato, se ubicó en el orden de  $10^5$  UFC/g suelo seco para ambos sitios. En estudios llevados a cabo en suelos de pradera de Uruguay se obtuvieron valores de abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfato de entre  $10^4$  y  $10^6$  (Azziz et al., 2012). La abundancia de actinobacterias en los suelos sin tratar se ubicó en el orden de  $10^6$  UFC/g suelo seco para ambos suelos. En suelos del Uruguay el número de actinobacterias encontradas fue de entre  $4 \times 10^6$  y  $6 \times 10^7$  UFC/g suelo seco para pradera (Bajsa, 2008), mientras que en suelos de productores de caña de azúcar en Bella Unión los valores de abundancia fueron de  $10^6$ - $10^7$  (Fernández P., 2012), y de  $10^5$ - $10^6$  (Senatore, 2013). Los valores obtenidos respecto a la abundancia de bacterias amonificantes por medio de la técnica de número más probable, en los suelos estudiados previo a los tratamientos fueron de  $10^6$ - $10^7$  UFC/g suelo seco. En estudios de suelo de productores de caña de azúcar de Bella Unión se encontraron por medio de la misma técnica, valores promedio de entre  $10^6$ - $10^7$  UFC/g de suelo seco (Senatore, 2013).

No se verificaron diferencias significativas en cuanto a la abundancia de los distintos grupos bacterianos para los suelos analizados (L1 y LB2) respecto al control pasado el mes de aplicados los tratamientos. Respecto a la abundancia de bacterias heterótrofas totales, en estudios previos, se constató un aumento luego de 30 días de la aplicación de vinaza en concentraciones de  $300 \text{ m}^3/\text{ha}$  y  $450 \text{ m}^3/\text{ha}$ , respecto al tratamiento control utilizando las mismas técnicas de análisis pero para suelos diferentes (Senatore, 2013). En suelos brasileños tratados con vinaza obtenida de caña de azúcar en concentraciones de  $200 \text{ m}^3/\text{ha}$ ,  $400 \text{ m}^3/\text{ha}$

y 600 m<sup>3</sup>/ha se observó que la abundancia de este grupo no presentaba diferencias significativas pasados 30 días, pero sí las presentaba al cabo de 120 días para todas las concentraciones respecto al control (Carvalho Dos Santos et.al., 2009), mientras que en suelos tropicales destinados a la agricultura se observó un aumento de la abundancia para dosis bajas de aguas residuales provenientes de destilerías y una disminución de la abundancia para dosis muy concentradas (Tripathi 2011). En otro estudio previo, llevado a cabo también en suelos para cultivo de caña de azúcar en Bella Unión, se observaron diferencias significativas respecto a la abundancia de actinobacterias al aplicar vinaza en dosis de 300 m<sup>3</sup>/ha y 450 m<sup>3</sup>/ha pasado un mes del tratamiento (Fernández, 2012). Dicho efecto fue temporal (se observó los primeros meses luego de la aplicación) y dependió de la dosis aplicada y del tipo de suelo. En suelos de Bella Unión que han recibido aplicación de vinaza por 5-6 años consecutivos, el número de microorganismos por gramo de suelo seco determinado para cada grupo se encontró en los siguientes rangos: 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> bacterias heterótrofas, 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> bacterias amonificantes, 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> actinobacterias (Senatore et al., 2017). Un estudio de largo plazo (1979-2005) llevado a cabo en suelos de China mostró que la abundancia de bacterias amonificantes en las parcelas tratadas con fertilizante rico en materia orgánica, fósforo, potasio y nitrógeno (MPKN) aumentó en forma significativa, así como también la abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno, aunque en menor medida (Wei et al., 2010).

Estudios de otros autores han encontrado grandes variaciones en la abundancia y diversidad de las poblaciones bacterianas según los distintos ecosistemas, determinado en gran parte por el tipo de suelo presente en los sitios de estudio (Meliani et al., 2012). Las diferencias existentes entre los datos del presente trabajo y los previamente obtenidos podrían ser explicadas por las diferencias en los tipos de suelo, así como también diferencias a nivel ambiental como volumen de lluvia o sequías. Otro motivo podría ser que la composición de la vinaza no siempre presenta las mismas características químicas, sino que varía según lo obtenido luego del procesamiento de la caña durante la producción de bioetanol.

Se puede observar para todos los grupos microbianos, en ambos suelos de estudio, una alta homogeneidad entre las parcelas estudiadas ya que no existieron diferencias significativas respecto a las abundancias entre las muestras estudiadas. Adicionalmente, las técnicas dependientes de cultivo pueden no ser suficientemente sensibles para detectar variaciones menores en la abundancia.

## 2. Actividad microbiana

La producción de CO<sub>2</sub>, es un dato que revela directamente la respiración de los microorganismos presentes en una muestra de suelo y permite determinar la actividad metabólica de los mismos, dato que resulta ser un bioindicador importante de la calidad del suelo (Montenegro et al., 2008). Se midió la producción de CO<sub>2</sub> mediante la técnica de respirometría a partir de muestras de suelo tomadas en distintas parcelas tratadas diferencialmente (control, fertilizante químico, vinaza 150m<sup>3</sup>/ha, vinaza 300m<sup>3</sup>/ha); la medida se llevó a cabo previo a la aplicación de los tratamientos y pasados 28 días.

Antes de la aplicación no se detectaron diferencias en este parámetro entre las diferentes parcelas de ambos suelos estudiados. Luego de 28 días se observó una disminución de la actividad respecto al muestreo inicial, pero no se observaron diferencias entre el control y los tratamientos con vinaza o fertilizante químico. En estudios de suelos uruguayos en Bella Unión, se observó un aumento de la actividad microbiana respecto al control en uno de los sitios estudiados. Este aumento se observó a los 14 y 50 días así como también a los 5 meses del tratamiento con vinaza (dosis de 300m<sup>3</sup>/ha y 450m<sup>3</sup>/ha) pero una vez pasados 8 y 13 meses no se apreciaron diferencias significativas respecto al control. En el mismo estudio, pero en otro sitio tratado con las mismas dosis de vinaza, no se observaron diferencias significativas respecto al control en ninguno de los momentos de muestreo (Senatore D., 2013).

En India donde se analizó el efecto del vertido de lodos provenientes del tratamiento de residuos de destilerías sobre suelos tropicales destinados a la agricultura, se observó un aumento inicial en la producción de CO<sub>2</sub> reflejando de este modo el incremento de la actividad microbiana: la mayor actividad se encontró entre 30 y 60 días después de la aplicación, constatándose luego una gradual disminución de la actividad con el paso del tiempo (Tripathi 2011). Se observó en estudios de suelos de Estonia, un aumento en la respiración microbiana analizada por respirometría, así como también un aumento en la capacidad de nitrificación del suelo pasados dos años de tratamiento con aguas residuales muy abundantes en materia orgánica, aunque se vio una gran variación entre los controles iniciales y los finales (Truu M et al., 2009). En diversos estudios llevados a cabo utilizando desechos con alto contenido de materia orgánica, potasio, nitrógeno y fósforo, siendo éstos muy similares a la vinaza se obtuvieron resultados en los que aumentó la actividad microbiana a lo largo del tiempo. En suelos de Mallorca se observó un aumento en la actividad microbiana de suelos tratados con fertilizante rico en nitrógeno principalmente, siendo adjudicado este aumento a

la movilización de nutrientes en el suelo (López G. et al., 2012). En suelos cercanos a Sevilla tratados con vinaza de remolacha como biofertilizante se observó una disminución en la actividad microbiana del suelo así como también en la biomasa presente en el mismo, aunque al combinar esta vinaza cruda sin tratar con otro fertilizante obtenido a partir de desechos de plantas leguminosas el efecto obtenido fue el contrario, observándose un aumento en ambos parámetros (Tejada M. et al., 2008). Un estudio llevado a cabo en suelos de Bella Unión reveló un aumento en la biomasa de hongos filamentosos con aplicación de vinaza mientras que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la biomasa microbiana obtenida por método de fumigación-extracción (Loperena et al., 2012).

Según los datos obtenidos en el presente trabajo, la aplicación de las dosis de vinaza de 150m<sup>3</sup>/ha y 300m<sup>3</sup>/ha no afectó la actividad microbiana en los dos suelos de estudio pasados 30 días de la aplicación de la misma, en las épocas de estudio. La disminución de la actividad microbiana pasado un mes de estudio, observada en ambos suelos, tanto en parcelas tratadas como en las parcelas control demuestra la gran variabilidad natural intrínseca de la actividad presente en estos sitios. Estos datos contrastan con los estudios antes mencionados y puede deberse a una variedad y combinación de factores, como son las causas ambientales, lluvias y sequías, la composición diferencial de la vinaza, y/o los tipos de suelo.

### **3. Estudio de la estructura de la comunidad bacteriana**

El análisis de las comunidades microbianas de suelo mediante secuenciación masiva de la región V4 del gen del ARNr 16S está siendo utilizado cada vez más en el mundo. Ésta es una de regiones altamente variables de un gen que se encuentra muy conservado, y que por lo tanto está presente en todos los organismos. Por esta razón es muy utilizado para el estudio taxonómico y filogenético ya que brinda información acerca las distancias evolutivas entre especies, en este caso entre microorganismos (Milani et al., 2013).

El número, identidad y abundancia de especies define la composición de una comunidad. La diversidad alfa, es decir la composición de las especies dentro de una comunidad, fue obtenida a partir de los datos obtenidos y graficada en forma de curva de rarefacción donde se observó el inicio de una meseta para todas las muestras, sin tratamientos y un mes después de los mismos, indicando que para la distancia genética utilizada se está alcanzando la saturación por lo cual el esfuerzo de muestreo cubre casi el total de la diversidad taxonómica. Teniendo en cuenta que el esfuerzo de muestreo puede afectar los análisis de diversidad es que se utiliza un muestreo de secuencias al azar, para asegurar

que el mismo número de reads sean comparados tanto en muestras grandes como pequeñas (Pylro V.S. et al., 2014), Las muestras de suelo son por lo general muy heterogéneas y presentan una gran variabilidad y diversidad de especies, por lo que el resultado obtenido es óptimo ya que requeriría un esfuerzo económico de muestreo muy superior si se quisiera alcanzar dicha saturación. El muestreo incompleto de hongos y bacterias en estudios de secuenciación masiva de suelos es común y ha sido reportado previamente, estudios con un esfuerzo de muestreo mucho mayor han fallado en alcanzar la saturación deseada (Vargas-Gastélum et al., 2015; Fay et al., 2016).

La diversidad beta está definida como la diferencia en la composición de especies entre distintas comunidades y se encuentra relacionada con la ecología y biología evolutiva (Leprieur F. et al., 2012). Se llevó a cabo un análisis estadístico de coordenadas principales (PCoA), mediante el cual se obtiene la diversidad beta en función de la distancia filogenética entre las OTUs de las distintas muestras (UniFrac). UniFrac junto con el análisis multivariado permite identificar factores que expliquen los patrones de las comunidades microbianas.

El análisis se llevó a cabo utilizando dos métodos: Unweighted UniFrac que mide la distancia filogenética entre diferentes muestras, tomando en cuenta una fracción del largo de rama del árbol filogenético que conduce a los descendientes de una muestra o la otra pero no de ambas, y el método Weighted UniFrac que además del algoritmo anterior, también sopesa las abundancias de OTUs en el cálculo de las distancias (Lozupone et al., 2011). Los resultados obtenidos para este parámetro no difieren entre las distintas muestras para ninguno de los suelos. No se observaron agrupaciones en cuanto a las distancias filogenéticas de los microorganismos presentes en las comunidades microbianas dependientes del tratamiento, ni relación con los parámetros químicos de suelo estudiados (pH, concentración de calcio, magnesio, potasio y sodio) tanto en las muestras sin tratar, como en las muestras de un mes posterior a los tratamientos. Esto significa que la estructura de la comunidad no se agrupó según los distintos tratamientos, lo cual podría deberse a una variedad y combinación de factores, entre ellos las causas ambientales como lluvias y sequías que podrían afectar la adsorción de vinaza por parte de los suelos, así como también puede que sean necesarias un mayor número de aplicaciones de vinaza, e incluso realizar el estudio una vez pasado más tiempo para lograr observar un posible efecto acumulativo de la aplicación de vinaza.

Los gráficos de porcentaje de abundancia relativa para cada una de las muestras de suelo

(suelos L1 y LB2) previas a la aplicación y un mes pasada la misma, no mostraron diferencias significativas en los porcentajes de los filos presentes. Se encontró que los filos más abundantes fueron Acidobacteria (37,2% suelo L1, 42% suelo LB2), Proteobacteria (24,7% suelo L1, 24.5% suelo LB2), Verrucomicrobia (13% suelo L1, 11,4% suelo LB2), Actinobacteria (5,7% suelo L1, 4,9% suelo LB2), y en menor medida la presencia de los filos Gemmatimonadetes, Firmicutes, Wps-2, Planctomycetes.

Estudios previos de comunidades bacterianas del suelo por pirosecuenciación de la región variable del gen que codifica al ARNr 16S han obtenido resultados similares en cuanto a la composición de las comunidades bacterianas de suelos sin tratar. Un estudio llevado a cabo analizando muestras de 88 suelos de cultivo de ecosistemas diferentes, obtuvo que los grupos bacterianos principales encontrados fueron: Acidobacteria (31%), Alphaproteobacteria (18%), Actinobacteria (13%), Bacteroidetes (11%), Beta/Gammaproteobacteria (11%), Firmicutes (3%), Deltaproteobacteria (2%), Gemmatimonadetes (1.5%), TM7 (1.0%), Verrucomicrobia (0.9%) y Cianobacteria (0.7%) (Lauber et al., 2009). Otro estudio llevado a cabo en suelos tratados con distintos fertilizantes, entre los cuales fue utilizada la vinaza, obtuvo resultados similares en cuanto a presencia de filos en las muestras de suelo. Se observó la presencia de: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cloroflexi, Firmicutes, y Gemmatimonadetes principalmente, así como también una correlación entre el aumento en la aparición del taxa Firmicutes con la aplicación de vinaza (Pitombo et al., 2016). En cuanto a los gráficos de abundancia relativa de Clases solamente se observaron diferencias en las muestras tratadas con vinaza del suelo L1 para la clase Clostridia, perteneciente al Phylum Firmicutes la cual aumentó de 0,3% a 6,5%, y dicho aumento es coincidente con la bibliografía (Pitombo et al., 2016).

### **Consideraciones finales**

La abundancia y actividad de los microorganismos de los suelos estudiados no se vio modificada por el agregado de vinaza (en dosis de 150m<sup>3</sup>/ha y 300m<sup>3</sup>/ha) o fertilizante químico respecto al control, en ambos sitios de estudio (suelos L1 y LB2) al mes de aplicados dichos tratamientos. La diversidad y estructura de las comunidades bacterianas tampoco se vio afectada por dichos tratamientos pasado un mes de la aplicación. La presencia de los grupos microbianos estudiados es deseable en el suelo debido a su capacidad para descomponer la materia orgánica, reciclar nutrientes y promover el crecimiento de las plantas. La abundan-

cia de los microorganismos estudiados, la actividad microbiana y la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en los suelos de estudio no se vieron afectadas por la utilización de vinaza como biofertilizante en las dosis evaluadas.

# ANEXOS

## ANEXO 1. Medios de cultivo

Tryptic Soy Agar 1/10 (TSA 1/10) (Smit et al., 2001)	
Componente	Cantidad
TSB	3 g
Agar	15 g
Agua desionizada c.s.p.	1000 mL

Starch Casein Agar (SCA) (Leoni y Ghini, 2003)	
Componente	Cantidad
Almidón	10 g
Caseína	0,3 g
KNO <sub>3</sub>	2 g
NaCl	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agar	16 g
Agua desionizada c.s.p.	1000 mL

Medio para cuantificar bacterias amonificantes (Seeley et al., 1991).	
Componente	Cantidad
Peptona	40 g
Agua desionizada c.s.p.	1000 mL

Medio King's B (KB) (King et al., 1954).	
Componente	Cantidad
Peptona No. 3	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
MgSO <sub>4</sub>	1.5 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000mL
glicerol	10mL

NFb (Döbereiner, 1980).	
Componente	Cantidad
Ácido Málico	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	20 mg
Solución de elementos traza (1)	2 ml
KOH 0.2N en Solución acuosa de Azul de bromotimol (0.5%)	2 ml
FeEDTA (1.64%)	4 ml
Solución de vitaminas (2)	1 ml
KOH	4 g
Agar	16 g
Agua destilada	1000 mL

NBRIP (Nautilyal, 1999).	
Componente	Cantidad
Glucosa	10 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g
KCl	0.2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 g
Agar	20g
Agua desionizada c.s.p.	1000 mL

1 – Composición de la solución de elementos traza del medio NFb: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.2g; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0.235g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.28g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.008g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.024g; agua destilada, 1000ml.

2 – Composición de la solución de vitaminas del medio NFb: Biotina, 0.01g; piridoxina, 0.02g; agua destilada 1000ml.

## ANEXO 2. Reactivo de Nessler

Se prepararon por separado las soluciones A y B y se dejaron enfriar. Se agregó luego la solución B a la solución A y se llevó el volumen a 500 ml con agua destilada. Se dejó decantar durante una semana antes de su uso. Se guardó a temperatura ambiente y a la oscuridad (Seeley et al., 1991).

Solución A	
Ioduro de Potasio (KI)	35g
Ioduro de Mercurio (HgI <sub>2</sub> )	50g
Agua destilada (H <sub>2</sub> O)	200mL

Solución B	
Hidróxido de sodio (NaOH)	50g
Agua destilada (H <sub>2</sub> O)	250mL

### ANEXO 3. Secuencia de cebadores utilizados

Cebadores con adaptadores y barcodes dirigidos a la región V4 del gen ARNr 16S del dominio *Bacteria* utilizados (Claesson M.J. et al., 2009; Milani et al., 2013).

Cebador	ID cebador	Adaptador	Barcode	Oligo
1	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	CTAAGGTAAC	AYTGGGYDTAAAGNG
2	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TAAGGAGAAC	AYTGGGYDTAAAGNG
3	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	AAGAGGATTC	AYTGGGYDTAAAGNG
4	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TACCAAGATC	AYTGGGYDTAAAGNG
5	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	CAGAAGGAAC	AYTGGGYDTAAAGNG
6	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	CTGCAAGTTC	AYTGGGYDTAAAGNG
7	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TTCGTGATTC	AYTGGGYDTAAAGNG
8	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TTCCGATAAC	AYTGGGYDTAAAGNG
9	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TGAGCGGAAC	AYTGGGYDTAAAGNG
10	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	CTGACCGAAC	AYTGGGYDTAAAGNG
11	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCCTCGAATC	AYTGGGYDTAAAGNG
12	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TAGGTGGTTC	AYTGGGYDTAAAGNG
13	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCTAACGGAC	AYTGGGYDTAAAGNG
14	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TTGGAGTGTC	AYTGGGYDTAAAGNG
15	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCTAGAGGTC	AYTGGGYDTAAAGNG
16	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCTGGATGAC	AYTGGGYDTAAAGNG
17	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCTATTCGTC	AYTGGGYDTAAAGNG
18	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	AGGCAATTGC	AYTGGGYDTAAAGNG
19	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TTAGTCGGAC	AYTGGGYDTAAAGNG
20	520F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	CAGATCCATC	AYTGGGYDTAAAGNG

HETERÓTROFOS LB2		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	7,17x10 <sup>7</sup>	7,10x10 <sup>7</sup>
F	7,42x10 <sup>7</sup>	7,28x10 <sup>7</sup>
150 m3/ha	7,6x10 <sup>7</sup>	7,40x10 <sup>7</sup>
300 m3/ha	7,33x10 <sup>7</sup>	7,40x10 <sup>7</sup>

HETERÓTROFOS L1		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	7,2x10 <sup>7</sup>	7,18x10 <sup>7</sup>
F	7,04x10 <sup>7</sup>	7,07x10 <sup>7</sup>
150 m3/ha	7,02x10 <sup>7</sup>	7,37x10 <sup>7</sup>
300 m3/ha	7,02x10 <sup>7</sup>	7,16x10 <sup>7</sup>

PSEUDOMONAS LB2		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	3,71x10 <sup>4</sup>	3,15x10 <sup>3</sup>
F	4,08x10 <sup>4</sup>	3,73x10 <sup>4</sup>
150 m3/ha	3,07x10 <sup>3</sup>	3,68x10 <sup>4</sup>
300 m3/ha	4,34x10 <sup>4</sup>	3,57x10 <sup>4</sup>

PSEUDOMONAS L1		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	4,77x10 <sup>4</sup>	3,08x10 <sup>3</sup>
F	4,38x10 <sup>4</sup>	2,83x10 <sup>3</sup>
150 m3/ha	3,82x10 <sup>3</sup>	3,13x10 <sup>3</sup>
300 m3/ha	4,06x10 <sup>4</sup>	2,96x10 <sup>3</sup>

BACILLUS LB2		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	6,66x10 <sup>6</sup>	6,82x10 <sup>6</sup>
F	6,96x10 <sup>6</sup>	6,97x10 <sup>6</sup>
150 m3/ha	6,65x10 <sup>6</sup>	6,14x10 <sup>6</sup>
300 m3/ha	6,71x10 <sup>6</sup>	7,11x10 <sup>6</sup>

BACILLUS L1		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	6,13x10 <sup>6</sup>	5,91x10 <sup>6</sup>
F	6,34x10 <sup>6</sup>	6,32x10 <sup>6</sup>
150 m3/ha	6,06x10 <sup>6</sup>	6,36x10 <sup>6</sup>
300 m3/ha	6,55x10 <sup>6</sup>	6,68x10 <sup>6</sup>

FIJADORAS DE N LB2		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	6,21x10 <sup>6</sup>	6,61x10 <sup>6</sup>
F	6,25x10 <sup>6</sup>	6,42x10 <sup>6</sup>
150 m3/ha	6,75x10 <sup>6</sup>	6,31x10 <sup>6</sup>
300 m3/ha	6,78x10 <sup>6</sup>	6,79x10 <sup>6</sup>

FIJADORAS DE N L1		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	6,49x10 <sup>6</sup>	6,69x10 <sup>6</sup>
F	6,42x10 <sup>6</sup>	6,63x10 <sup>6</sup>
150 m3/ha	6,36x10 <sup>6</sup>	6,77x10 <sup>6</sup>
300 m3/ha	6,84x10 <sup>6</sup>	6,66x10 <sup>6</sup>

SOLUBILIZADORAS DE P LB2		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	5,16x10 <sup>5</sup>	5,48x10 <sup>5</sup>
F	5,37x10 <sup>5</sup>	5,42x10 <sup>5</sup>
150 m3/ha	4,94x10 <sup>5</sup>	5,25x10 <sup>5</sup>
300 m3/ha	5,13x10 <sup>5</sup>	5,41x10 <sup>5</sup>

SOLUBILIZADORAS DE P L1		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	5,44x10 <sup>5</sup>	5,2x10 <sup>5</sup>
F	5,25x10 <sup>5</sup>	4,96x10 <sup>5</sup>
150 m3/ha	5,36x10 <sup>5</sup>	5,46x10 <sup>5</sup>
300 m3/ha	5,37x10 <sup>5</sup>	5,38x10 <sup>5</sup>

ACTINOBACTERIAS LB2		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	6,47x10 <sup>6</sup>	6,12x10 <sup>6</sup>
F	6,49x10 <sup>6</sup>	6,01x10 <sup>6</sup>
150 m3/ha	6,47x10 <sup>6</sup>	6,36x10 <sup>6</sup>
300 m3/ha	6,47x10 <sup>6</sup>	6,41x10 <sup>6</sup>

ACTINOBACTERIAS L1		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	6,49x10 <sup>6</sup>	6,33x10 <sup>6</sup>
F	6,49x10 <sup>6</sup>	6,41x10 <sup>6</sup>
150 m3/ha	6,31x10 <sup>6</sup>	6,43x10 <sup>6</sup>
300 m3/ha	6,53x10 <sup>6</sup>	6,54x10 <sup>6</sup>

AMONIFICANTES LB2		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	6,82x10 <sup>7</sup>	7,12x10 <sup>7</sup>
F	7,04x10 <sup>7</sup>	7,32x10 <sup>7</sup>
150 m3/ha	6,88x10 <sup>7</sup>	7,13x10 <sup>7</sup>
300 m3/ha	6,89x10 <sup>7</sup>	6,98x10 <sup>7</sup>

AMONIFICANTES L1		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
0	6,79x10 <sup>6</sup>	7,1x10 <sup>6</sup>
F	6,67x10 <sup>6</sup>	6,76x10 <sup>6</sup>
150 m3/ha	6,66x10 <sup>6</sup>	7,73x10 <sup>7</sup>
300 m3/ha	6,61x10 <sup>6</sup>	6,85x10 <sup>6</sup>

**ANEXO 4. Tablas de abundancia:** Valores medios de 3 repeticiones de abundancia de los distintos grupos bacterianos expresados en UFC/g de suelo seco para distintos tratamientos del

Suelo L1			Suelo LB2		
Respiración microbiana (mg c- CO <sub>2</sub> /KG suelo seco)			Respiración microbiana (mg c-CO <sub>2</sub> /KG suelo seco)		
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28	Tratamiento	DÍA 0	DÍA 28
Control	9,76	5,62	Control	14,68	4,61
Fertilizante	8,86	6,41	Fertilizante	25,57	5,71
150 m <sup>3</sup> /ha	8,48	5,22	150 m <sup>3</sup> /ha	19,62	6,85
300 m <sup>3</sup> /ha	10,12	5,98	300 m <sup>3</sup> /ha	14,97	5,19

**ANEXO 5. Respirometría.** Respiración microbiana en suelo L1 y LB2 antes y después de la aplicación de fertilizante y vinaza.

## BIBLIOGRAFIA

- Agaras B, Wall LG, Valverde C (2012) Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina. *Appl Soil Ecol* 61:305–319 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.016>.
- Azziz G, Bajsa N, Haghjou T, Taulé C, Valverde Á, Igual JM, Arias A (2012) Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Appl Soil Ecol* 61:320–326 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.004>.
- Babu S (2011) *Pseudomonas fluorescens*-mediated biocontrol in the post-genomic era: From lab to lab to land. *Biotechnol J* 6:488–491.
- Baca BE, Soto Urzua L, Pardo Ruiz MP (2000) Fijación biológica de nitrógeno. Available at: <http://www.elementos.buap.mx/num38/htm/43.html>.
- Bajsa N. (2008). Efecto del pastoreo bovino sobre la comunidad bacteriana en un suelo de pradera natural. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias – UDELAR.
- Bajsa N., (2015) Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en suelos con rotación de cultivos Tesis de Doctorado.
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk H-P, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP (2016) Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1–43.
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1327–1350.
- Bürgmann H, Widmer F, Sigler W Von, Bu H (2004) New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil. *New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil*. 70.
- Cano MA (2011) Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. UDCA. Actualidad & divulgación científica 2011 vol: 14 (2) pp: 15-31.
- Caporaso JG et al. (2010) correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat Publ Gr* 7:335–336.
- Caporaso JG et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336 Available at: <http://www.nature.com/articles/nmeth.f.303>
- Carvalho dos Santos M, Aurélio Lins dos Santos Eng<sup>o</sup> Agrônomo M, Sc D, Das A, Rosendo dos Santos V (n.d.) EFFECT OF FERTIRRIGATION WITH IN NATURE VINASSE ON THE MICROORGANISM OF THE SOIL. *Rev Caatinga*, vol. 22, núm. 1, pp. 155-160. Available at: <http://www.redalyc.org/pdf/2371/237117625021.pdf>

- Chakraborty A, Chakrabarti K, Chakraborty A, Ghosh S (2011) Effect of long-term fertilizers and manure application on microbial biomass and microbial activity of a tropical agricultural soil. *Biol Fertil Soils* 47:227–233
- Chen Y, Avnimelech Y (1986) The Role of organic matter in modern agriculture. Ed Martinus Nijhoff. 306 p.
- Chen G, Zhu H, Zhang Y (2003) Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Res Microbiol* 154:393–398.
- Choudhary DK, Johri BN (2009) Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol Res* 164:493–513.
- Christofolletti CA, Escher JP, Correia JE, Marinho JFU, Fontanetti CS (2013) Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Manag* 33:2752–2761.
- Claesson MJ, O’Sullivan O, Wang Q, Nikkilä J, Marchesi JR, Smidt H, de Vos WM, Ross RP, O’Toole PW (2009) Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine Ahmed N, ed. *PLoS One* 4:e6669 Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006669>.
- DeLuca TH, Drinkwater LE, Wiefeling BA, DeNicola DM (1996) Free-living nitrogen-fixing bacteria in temperate cropping systems: Influence of nitrogen source. *Biol Fertil Soils* 23:140–144.
- Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan SM (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 159:371–394 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501304000710>.
- Döbereiner J (1980) Forage grasses and grain crops. *Forage grasses grain Crop*:535–555 Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19810719492>.
- Fay BJ, Corrigan A, Murphy RA (2016) Short-term effects of mechanical drainage on fungal and bacterial community structure in a managed grassland soil. *Appl Soil Ecol* 101:93–100 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139316300142>.
- Fernández P., (2012) Efecto de la aplicación de vinaza en cultivos de caña de azúcar sobre la comunidad microbiana del suelo. Tesis de grado.
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Butterbach-Bahl K, Dentener F, Stevenson D, Amann M, Voss M (2013) The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:20130164 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23713126>.
- Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J* 1:19–27.
- Frioni L. (2006). Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Uruguay.

- Goodfellow M, Williams ST (1983) Ecology of Actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 37:189–216 Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>.
- Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G (2006) Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* 24:549–556.
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Ann Microbiol* 60:579–598.
- Horner-Devine MC, Carney KM, Bohannon BJM (2004) An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc Biol Sci* 271:113–122.
- Kennedy a C, Smith KL, Publishers KA (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* 170:75–86 Available at: [PlantSoil170\\_75.pdf](http://www.plant-soil.com/PlantSoil170_75.pdf).
- Kennedy IR, Choudhury ATM., Kecskés ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol Biochem* 36:1229–1244 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071704001221>.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44:301–307 Available at: [https://www.translationalres.com/article/0022-2143\(54\)90222-X/abstract](https://www.translationalres.com/article/0022-2143(54)90222-X/abstract).
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 58:169–188.
- Kishore GK, Pande S, Podile AR (2006) *Pseudomonas aeruginosa* GSE 18 inhibits the cell wall degrading enzymes of *Aspergillus niger* and activates defence-related enzymes of groundnut in control of collar rot disease. *Australas Plant Pathol* 35:259.
- Kolb S, Knief C, Stubner S, Conrad R (2003) Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA- targeted real-time PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 69:2423–2429.
- Kucey RMN, Janzen HH, Leggett ME (1989) Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv Agron* 42:199–228.
- Kumar A, Prakash A, Johri BN (2011) Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem. In: *Bacteria in Agrobiol-ogy: Crop Ecosystems*, pp 37–59. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-18357-7\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-18357-7_2).
- Lan Y, Wang Q, Cole JR, Rosen GL (2012) Using the RDP classifier to predict taxonomic novelty and reduce the search space for finding novel organisms. *PLoS One* 7:1–15.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N (2009) Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *75:5111–5120*.
- Leoni, C., & Ghini, R. (2003). Efeito do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade in vitro a *Phytophthora nicotianae*. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 67–75.

- Leprieur F, Albouy C, De Bortoli J, Cowman PF, Bellwood DR, Mouillot D (2012) Quantifying Phylogenetic Beta Diversity: Distinguishing between ‘True’ Turnover of Lineages and Phylogenetic Diversity Gradients Shawkey M, ed. PLoS One 7:e42760 Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0042760>.
- Loperena L., Musso M., Saravia V., Bajsa N., Senatore D., Pereira S., Fernández P., Fajardo L., Betucci L., y Lupo S. (2012). Determinación de los cambios físicos químicos y biológicos en suelos cultivados con caña de azúcar en Bella Unión por aplicación de vinaza. Informe final del proyecto de vinculación ANCAP- UdelaR 2009.
- López-López G, Lobo MC, Negre A, Colombàs M, Rovira JM, Martorell A, Reolid C, Sastre-Conde I (2012) Impact of fertilisation practices on soil respiration, as measured by the metabolic index of short-term nitrogen input behaviour. J Environ Manage 113:517–526 Available at: <http://linking-hub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479712001296>.
- Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 71:8228–8235 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16332807>.
- Lozupone C, Hamady M, Knight R (2006) UniFrac – An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. BMC Bioinformatics 7:371 Available at: <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-7-371>.
- Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R (2011) UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. ISME J 5:169–172 Available at: <http://www.nature.com/articles/ismej2010133>.
- Mark GL, Morrissey JP, Higgins P, O’Gara F (2006) Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. FEMS Microbiol Ecol 56:167–177.
- Meliani A, Bensoltane A, Mederbel K (2012) Microbial Diversity and Abundance in Soil: Related to Plant and Soil Type. Am J Plant Nutr Fertil Technol 2:10–18.
- Meredith LK, Rao D, Bosak T, Klepac-Ceraj V, Tada KR, Hansel CM, Ono S, Prinn RG (2014) Consumption of atmospheric hydrogen during the life cycle of soil-dwelling actinobacteria. Environ Microbiol Rep 6:226–238 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/1758-2229.12116>.
- Merriman B, Rothberg JM (2012) Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. Electrophoresis 33:3397–3417.
- Milani C, Hevia A, Foroni E, Duranti S, Turrone F, Lugli GA, Sanchez B, Martín R, Gueimonde M, van Sinderen D, Margolles A, Ventura M (2013) Assessing the Fecal Microbiota: An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol Quince C, ed. PLoS One 8:e68739 Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0068739>.
- Montenegro S.P. (2008). Influencia de la aplicación de vinaza sobre la presencia, actividad y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de maíz dulce (*Zea Mays*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia.

- Nadkarni MA, Martin FE, Hunter N, Jacques NA (2009) Methods for optimizing DNA extraction before quantifying oral bacterial numbers by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 296:45–51 Available at: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01629.x>.
- Nakhro N, Dkhar MS (2010) Impact of organic and inorganic fertilizers on microbial populations and biomass carbon in paddy field soil. *J Agron* 9:102–110
- Navarrete AA, Diniz TR, Braga LPP, Silva GGZ, Franchini JC, Rossetto R, Edwards RA, Tsai SM (2015) Multi-analytical approach reveals potential microbial indicators in soil for sugarcane model systems. *PLoS One* 10:1–19.
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170:265–270 Available at: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x> .
- Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci* 98:12215–12220.
- Paredes M (2010) Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por Rizobacterias que solubilizan fosfato. [Tesis doctoral]. México.
- Pitombo LM, do Carmo JB, de Hollander M, Rossetto R, López M V., Cantarella H, Kuramae EE (2016) Exploring soil microbial 16S rRNA sequence data to increase carbon yield and nitrogen efficiency of a bioenergy crop. *GCB Bioenergy* 8:867–879.
- Pyro VS, Roesch LFW, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótolá MR (2014) Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods* 107:30–37 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.018>.
- Ramos E. & Dávila D. (2008) Efecto De La Humedad, Temperatura Y Ph Del Suelo En La Actividad Microbiana a Nivel De Laboratorio Soil Microbial Activity in Response To Different Conditions of Moisture, Temperature or Ph. *Ecol Apl* 710:2002–5474 Available at: <http://www.redalyc.org/pdf/341/34111584015.pdf>.
- Ritz K (2007) The Plate Debate: Cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 60:358–362 Available at: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2007.00331.x>.
- Roller C, Ludwig W, Schleifer KH (1992) Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. *J Gen Microbiol* 138:1167–1175.
- Rossetto A (1987) Utilização agrônômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. *Cana-de-açúcar: cultivo e utilização*. Campinas:Fundação Cargill, v.2, p.435-504.
- Ruttenberg, KC (2003). The global phosphorus cycle. *Treatise on Geochemistry, Volume 8*. pp. 682. ISBN 0-08-043751-6. Elsevier, 2003, p.585-643

- Santana VS, Fernandes Machado NRC (2008) Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. *Catal Today* 133–135:606–610.
- Santos TMC, Santos MAL, Santos CG, Santos VR, Pacheco DS (2009) Effect of Fertirrigation With in Nature Vinasse on the Microorganism of the Soil. *Rev Caatinga* 22:155–160.
- Seeley H.W., Vandermark P.J., y Lee J.J. (1991). *Microbes in action: a laboratory manual*. W.H. Freeman and Company, New York, USA. 4ta Edición, p. 389-391.
- Senatore D., (2013) Vinaza como fertilizante de caña azucarera: efecto sobre la comunidad bacteriana del suelo. Tesis de maestría
- Senatore D., Queirolo A., Wajswol S., Bajsa N. (2017) Monitoreo de la aplicación de vinaza como fertilizante en caña de azúcar con indicadores microbianos de suelo. *researchgate.net* Available at: [https://www.researchgate.net/profile/Daniella\\_Senatore/publication/321946122](https://www.researchgate.net/profile/Daniella_Senatore/publication/321946122).
- Serna F, Barrera L, Montiel H (2011) Impacto Social y Económico en el uso de Biocombustibles. *J Technol Manag Innov* 6:100–114.
- Sharma S, Kumar V, Tripathi RB (2011) Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *J Microbiol Biotechnol Res Sch Res Libr J Microbiol Biotech Res* 1:90–95 Available at: <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>.
- Shukla SK, Yadav RL, Suman A, Singh PN (2008) Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. *Soil Tillage Res* 99:158–168 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016719870800024X>.
- Smit E, Leeflang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S, Wernars K (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol* 67:2284–2291 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319113>.
- Sparling G, West A. W.(1990) A comparison of gas chromatography and differential respirometer methods to measure soil respiration and to estimate the soil microbial biomass. *Pedobiologia* Vol.34 No.2 pp.103-112.
- Suela Silva M, Naves Sales A, Teixeira Magalhães-Guedes K, Ribeiro Dias D, Schwan RF (2013) Brazilian Cerrado soil Actinobacteria ecology. *Biomed Res Int* 2013:503805 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555089>.
- Sundara B, Natarajan V, Hari K (2002) Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *F Crop Res* 77:43–49.
- Tejada M, Gonzalez JL, García-Martínez AM, Parrado J (2008) Application of a green manure and green manure composted with beet vinasse on soil restoration: Effects on soil properties. *Biore-sour Technol* 99:4949–4957.
- Thwaites R (2011) Book Review: *Soil microbiology and sustainable crop production* (G.R. Dixon & E.L. Tilston). *Plant Pathol* 60: 998.

- Tripathi BD (2011) A Short Term Study on Toxic Effects of Distillery Sludge Amendment on Microbiological and Enzymatic Properties of Agricultural Soil in a Tropical City. *J Earth Sci Clim Change* 02:1–8 Available at: <http://www.omicsonline.org/2157-7617/2157-7617-2-106.digitial/2157-7617-2-106.html>.
- Truu M, Truu J, Heinsoo K (2009) Changes in soil microbial community under willow coppice: The effect of irrigation with secondary-treated municipal wastewater. *Ecol Eng* 35:1011–1020.
- Vargas-Gastélum L, Romero-Olivares AL, Escalante AE, Rocha-Olivares A, Brizuela C, Riquelme M (2015) Impact of seasonal changes on fungal diversity of a semi-arid ecosystem revealed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 91 Available at: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1093/femsec/fiv044>.
- Varma A, Buscot F eds. (2005) *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/b137872>.
- Van Elsas JD, Garbeva P, Salles J (2002) Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation* 13:29–40 Available at: <http://link.springer.com/10.1023/A:1016393915414>
- Venkateswarlu B, Srinivasarao C (2013) Soil Microbial Diversity and the Impact of Agricultural Practices. *Indian J Dryland Agric Res & Dev*. 19:97-105.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:495–548.
- Wahyudi AT, Astuti RP, Widyawati A, Mery A, ini, Nawangsih AA (2011) Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3:34-40.
- Wei D, Xingzhu A, Shuang W and Baoku A (2010) Effect of long-term fertilization on organic matter , total nitrogen and microbe characteristic of black soil. *World*:44–47.
- Westheimer FH (1987) Why nature chose phosphates. *Science* 235:1173–1178.