

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

## Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales



# Efecto del pastoreo bovino sobre la comunidad bacteriana en un suelo de pradera natural

**Natalia BAJSA**

Montevideo, Uruguay

**Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales**

**Efecto del pastoreo bovino sobre la  
comunidad bacteriana en un suelo de  
pradera natural**

**Natalia BAJSA**

Orientadora: Alicia ARIAS

**Tribunal:**

Alice ALTESOR  
Claudia ETCHEBEHERE  
Margarita SICARDI

**Facultad de Ciencias, Universidad de la República**  
Montevideo, Uruguay

Julio, 2008

**Este trabajo fue realizado en:**

- ❖ Laboratorio de Ecología Microbiana  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable  
Ministerio de Educación y Cultura  
Montevideo, Uruguay

**y durante una pasantía en:**

- ❖ Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular  
Instituto de Microbiología Profesor Paulo de Góes  
Universidad Federal de Rio de Janeiro
  
- ❖ Laboratorio de Ecología de Suelos  
EMBRAPA Suelos  
Rio de Janeiro, Brasil

# AGRADECIMIENTOS

---

Esta tesis no hubiera sido posible sin:

- ❖ Alicia, quien se animó a adentrarse en el mundo de la diversidad microbiana... y se especializó en el zarandeo de las muestras de suelo
- ❖ Nora Altier y Stella Zerbino, con quienes comenzamos a interesarnos por la diversidad de la biota del suelo
- ❖ el personal de la Unidad Experimental Glencoe (INIA-Tacuarembó)
- ❖ Alfredo y Stella, quienes nos condujeron -literalmente- a Glencoe
- ❖ la Letty, quien colaboró en los muestreos a pesar de su fobia a encontrarse en el medio de la nada y al mondongo.
- ❖ Gastón y su trabajo en la toma de muestras, tamizado, recuentos, análisis estadísticos, etc., etc.... un coautor de esta tesis.
- ❖ el tamiz de Mercedes
- ❖ Alexandre Soares Rosado, quien accedió a recibirme en su laboratorio (LEMM, UFRJ) para entrenarme en la técnica de DGGE
- ❖ Ziza, Natália y Joyce, y su orientación en mis primeros pasos con esta técnica
- ❖ Cláudia y su ayuda en el análisis de los geles de DGGE
- ❖ Heitor da Costa Coutinho ("el Santo") quien me abrió generosamente las puertas de su laboratorio en Embrapa Solos
- ❖ Zé y Tuomas, y su hospitalidad en la Cidade Maravilhosa
- ❖ la Boni y Stella, y sus análisis multivariados
- ❖ la turma del Laboratorio de Ecología Microbiana, el Departamento de Bioquímica, la Unidad de Microbiología Molecular y la Unidad de Bioquímica y Genómica Microbiana... o como quieran llamarse
- ❖ Ceci y su apoyo incondicional, tanto en Rio como en Montevideo
- ❖ mi familia, que siempre está
- ❖ el apoyo económico de:
  - CSIC (Programa de Apoyo a Posgrados)
  - PDT-DICYT (Proyecto de Investigación PDT29/108)
  - UNU (Beca BIOLAC)
- ❖ el tribunal y sus aportes a esta tesis

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1. PRADERAS Y GANADERÍA	3
2. MICROORGANISMOS DEL SUELO	4
2.1. <i>Filogenia de las bacterias del suelo</i>	5
2.2. <i>Microorganismos promotores del crecimiento vegetal</i>	7
3. DIVERSIDAD MICROBIANA	8
3.1. <i>Beneficios ambientales y económicos de la diversidad microbiana</i>	10
3.2. <i>Métodos para el estudio de la diversidad microbiana</i>	10
3.2.1. Índices de diversidad	13
4. EFECTOS ANTROPOGÉNICOS SOBRE LA DIVERSIDAD MICROBIANA	14
5. CONSIDERACIONES FINALES	17
<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
1. Obtención de muestras de suelo	19
2. Recuentos bacterianos	21
Heterótrofos	21
<i>Pseudomonas</i> fluorescentes	21
<i>Bacillus</i> spp.	21
Actinobacterias	21
2.1. Humedad	21
3. Análisis molecular	21
3.1. Extracción de ADN	21
3.2. PCR	22
<i>Eubacteria</i>	22
<i>Pseudomonas</i> spp.	22
<i>Bacillus</i> spp.	23
<i>Actinobacteria</i>	23
3.3. DGGE	23
4. Análisis de datos	24
4.1. Recuentos bacterianos	24
4.2. DGGE	24
4.3. Impacto sobre la Diversidad Microbiana (IDM)	24
4.4. Análisis de correlaciones	25
4.5 Análisis multivariados	25
<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
1. Abundancia de bacterias cultivables en un suelo de pradera con o sin pastoreo	26
2. Caracterización de la diversidad bacteriana molecular en un suelo de pradera con o sin pastoreo	29
2.1. Diversidad del dominio <i>Eubacteria</i>	29
2.1.1. Impacto del pastoreo sobre la diversidad de <i>Eubacteria</i>	33
2.2. Diversidad del género <i>Pseudomonas</i>	34
2.3. Diversidad de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Actinobacteria</i>	37

3. Relaciones entre variables microbiológicas, físicas y químicas del suelo	38
3.1. Correlaciones entre variables	39
3.2. Análisis de Componentes Principales	40
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
1. Abundancia de bacterias cultivables en suelo	43
2. Diversidad molecular de comunidades bacterianas en suelo	44
3. Relaciones entre variables microbiológicas y fisicoquímicas del suelo	47
4. Pastoreo en praderas: efecto sobre el suelo y la comunidad vegetal	49
5. Pastoreo en praderas: efectos sobre la comunidad microbiana	51
5.1. Pastoreo en praderas: bacterias del ciclo del nitrógeno	55
5.2. Pastoreo en praderas: efectos sobre las micorrizas	59
6.1. Procesos asociados al pastoreo: defoliación	61
6.2. Procesos asociados al pastoreo: aporte de orina y heces	62
7. CONCLUSIONES	65
<b>REFERENCIAS</b>	<b>66</b>

## RESUMEN

---

En Uruguay, las praderas naturales representan el bioma más importante del país. La introducción del ganado vacuno ha modificado la estructura de la vegetación de pradera, provocando cambios en los balances de energía regional y global. Poco se sabe sobre cómo esta perturbación ha afectado la estructura de las comunidades microbianas del suelo, a pesar de que los procesos mediados por ellas son esenciales para la productividad y estabilidad de los ecosistemas.

Las comunidades microbianas son extremadamente diversas, y los recientes progresos en ecología microbiana molecular muestran que sólo el 1-10 % de las especies bacterianas han sido aisladas e identificadas, debido a que la mayoría no pueden ser cultivadas.

El objetivo de esta tesis fue determinar la influencia del pastoreo bovino sobre la comunidad bacteriana en un suelo de pradera, y su relación con otros componentes bióticos y abióticos del suelo. Se utilizó como modelo una pradera con un área sometida al pastoreo y otras dos áreas excluidas del mismo durante 10 o 20 años.

Se evaluó el efecto del pastoreo sobre la abundancia de determinadas poblaciones cultivables de bacterias, mediante recuento en placa. Se detectó un mayor número de actinobacterias en la pradera pastoreada que en las exclusiones. Los números de bacterias heterótrofas, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* fluorescentes no mostraron una respuesta consistente relacionada al pastoreo.

Se estudió la diversidad bacteriana mediante la amplificación por PCR del ADNr 16S a partir del ADN total del suelo y su análisis por DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante), incluyendo así los organismos no cultivables. Se observó un cambio en la composición de especies de la comunidad de *Eubacteria* relacionado al pastoreo, pero no en la estructura de la comunidad de *Pseudomonas* spp. Los valores de IDM (Impacto en la Diversidad Microbiana) calculados a partir del análisis de diversidad de *Eubacteria* evidenciaron un claro impacto del pastoreo sobre este dominio.

En un análisis de componentes principales incluyendo variables microbiológicas y fisicoquímicas del suelo, el primer componente ordenó las muestras según el tiempo de exclusión y el segundo de acuerdo a la estación del año. Las abundancias de actinobacterias y *Pseudomonas* fluorescentes se correlacionaron positivamente entre sí y negativamente con el pH y la cantidad de residuo vegetal sobre el suelo.

Los resultados de esta tesis aportaron conocimiento sobre las bacterias presentes en nuestros suelos, y permitieron establecer que el pastoreo bovino altera la estructura de la comunidad bacteriana de pradera.

### PLABRAS CLAVE:

comunidad bacteriana, diversidad, pastoreo por ganado bovino, pradera natural

# ABSTRACT

---

## Effect of cattle grazing on bacterial community in a natural grassland soil

In Uruguay, natural grasslands represent the most important biome of the country. The introduction of cattle has modified the structure of grassland vegetation, causing changes in regional and global energy balances. Little is known about how this disturbance has affected soil microbial communities structure, though microbial-mediated processes are essential for ecosystems productivity and stability.

Microbial communities are extremely diverse and recent progresses in molecular microbial ecology shown that only 1-10% of bacterial species have been isolated and identified, due to the fact that most of them cannot be cultivated.

The objective of this thesis was to determine the influence of cattle grazing on soil bacterial community in a grassland soil, and its relationship with other soil biotic and abiotic components. A grassland with a grazed area and other two areas excluded to cattle for 10 or 20 years was used as model.

The effect of grazing on bacterial cultivable populations was assessed by plate counting. It was detected a higher number of actinobacteria in grazed plot than in exclosures. Heterotrophic bacteria, *Bacillus* spp. and fluorescent *Pseudomonas* numbers did not show a consistent response related to grazing.

Bacterial diversity was studied by DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analysis of PCR-amplified 16S ADNr from total soil DNA, including not-cultivable organisms. A change related to grazing was observed in species composition of *Eubacterial* community, but not in *Pseudomonas* spp. community structure. IMD values (Impact on Microbial Diversity) calculated from *Eubacterial* diversity analysis showed a clear impact of grazing on this domain.

In a principal components analysis including several microbiological and physicochemical variables, the samples ordination along the first component was according to exclosure time, and according to seasons along the second one. Actinobacteria and fluorescent *Pseudomonas* abundances were positively correlated between them and negatively with pH and the quantity of plant residues over the soil.

The results of this thesis contributed to the knowledge of bacteria inhabiting our soils, and allowed establishing that cattle grazing impacts grassland bacterial community structure.

**KEYWORDS:** bacterial community, diversity, cattle grazing, natural grassland

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. PRADERAS Y GANADERÍA

Las praderas del Río de la Plata constituyen una de las áreas más extendidas de praderas naturales en el mundo, abarcando un área de 10 millones de hectáreas entre el este argentino, Uruguay y el sur de Brasil. En nuestro país, las praderas naturales representan el bioma más importante, ya que ocupan el 76 % de la superficie nacional (12.346.791 ha), en las cuales la ganadería es la actividad principal (Altesor, 2002).

Este bioma constituye la base fundamental de nuestra producción ganadera, por lo que el mayor porcentaje de los bienes con valor de mercado como la carne, la leche, la lana y el cuero depende de la producción de biomasa de la vegetación natural. Las praderas, sin embargo, proveen otros servicios o beneficios que, si bien no es fácil asignarles un “valor de mercado”, tienen enorme importancia para la población humana: los servicios ecosistémicos. Las praderas naturales contribuyen a mantener la composición atmosférica secuestrando carbono, absorbiendo metano y reduciendo las emisiones de óxido nitroso. También participan en la regulación del clima y mantienen la diversidad específica y genética. Su presencia disminuye las pérdidas de suelo por erosión, contribuye al ciclado de nutrientes y provee hábitats a numerosas especies animales (Altesor, 2002).

El ganado vacuno fue introducido en Uruguay hace 400 años, lo que ha modificado la estructura de la vegetación de pradera. Los efectos de la ganadería sobre la pradera natural son variados en cuanto a intensidad, y dependen de un conjunto de factores ambientales y de la historia del uso del sitio. Los efectos provocados por distintas intensidades de pastoreo, particularmente el sobrepastoreo, provocan cambios en la estructura, composición y cobertura de las comunidades vegetales. Estos cambios en la cobertura del suelo provocan cambios en los balances de energía regional y global. Resultados de modelos de simulación de los ciclos biogeoquímicos, señalan una pérdida de nitrógeno del suelo y una reducción del 22% en el carbono orgánico después de 400 años de pastoreo (Altesor, 2002).

Investigaciones en regiones de sub-montaña del Reino Unido, mostraron que variaciones a largo plazo en la frecuencia e intensidad del pastoreo por ovejas han llevado al desarrollo de ubicuas sucesiones de plantas (Bardgett *et al.*, 2001). La degradación de ecosistemas debido al sobrepastoreo ha sido constatada en la sabana semiárida del Chaco, Argentina. La vegetación original fue drásticamente alterada después de un corto pero intenso período de sobrepastoreo que siguió a la introducción del ganado por los europeos (Abril y Bucher, 1999). En estudios realizados en nuestras praderas se detectaron cambios en la composición de

especies vegetales, así como un descenso de la calidad forrajera debido al pastoreo (Rodríguez *et al.*, 2003; Altesor, 2002).

## 2. MICROORGANISMOS DEL SUELO

El suelo es un recurso no renovable a escala humana, crítico para la producción de alimentos, el balance global y el funcionamiento de los ecosistemas (Doran *et al.*, 1996). Su biota, ensamblada en intrincadas comunidades, contribuye colectivamente en un amplio rango de servicios esenciales para el funcionamiento sustentable de los ecosistemas. (Pankhurst, 1997; Kennedy, 1999). En particular, los microorganismos juegan roles vitales en varios ciclos geoquímicos y están implicados en diversos procesos importantes para la calidad del suelo: regulan la descomposición de la materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes y contribuyen a la formación y el mantenimiento de la estructura edáfica (Kirk *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2003). También influyen en el ecosistema contribuyendo a la nutrición y salud de las plantas, dado que sirven como depósito y fuente de la mayoría de los nutrientes, son capaces de solubilizar minerales, producir hormonas vegetales, fijar el nitrógeno atmosférico, causar enfermedades o antagonizar microorganismos deletéreos (Kirk *et al.*, 2004; Bardgett *et al.*, 1997).

Las bacterias son el grupo de microorganismos más numeroso, pero debido a su pequeño tamaño (1-10  $\mu\text{m}$ ) se estima que representan menos de la mitad de la biomasa total de los suelos agrícolas. Algunas estimaciones indican que se encuentran en poblaciones de  $10^4$ - $10^9$  células por gramo de suelo (Kennedy, 1999; Schinner, 1996). El funcionamiento de los ecosistemas está gobernado ampliamente por la dinámica de las bacterias del suelo, debido a la diversidad de procesos de los cuales son responsables. Las funciones bacterianas importantes en los ecosistemas se encuentran distribuidas entre diferentes grupos tróficos e incluyen: formación de humus mediante descomposición de exudados y restos vegetales y síntesis de nuevos compuestos, liberación de nutrientes para las plantas a partir de formas inorgánicas insolubles, transformación del  $\text{N}_2$  atmosférico a N disponible para las plantas, mejoramiento de la agregación, aireación, e infiltración de agua en el suelo, acción antagónica contra insectos, patógenos de plantas y malezas (control biológico) (Kennedy, 1999; Griffiths *et al.*, 2003).

Las comunidades bacterianas del suelo y los procesos mediados por ellas son críticos para el funcionamiento del ecosistema edáfico y su productividad. Por esto, existe la necesidad de integrar la comunidad bacteriana del suelo a nuestro entendimiento de las interacciones ecosistémicas a diferentes escalas (planta, comunidad vegetal y paisaje) (Kuske *et al.*, 2002).

Está bien establecido que la presencia o ausencia de grupos funcionales importantes de bacterias del suelo, por ejemplo los fijadores de nitrógeno, pueden tener una fuerte influencia en los procesos de las plantas y el suelo. Sin embargo, la comprensión de cómo la composición de bacterias dentro de los grupos funcionales (por ej. las heterótrofas) puede alterar la dinámica del ecosistema permanece incompleta. Dada la gran variación en las tasas de crecimiento y generación, y la capacidad para utilizar distintos sustratos orgánicos que presentan los diferentes géneros, es altamente probable que la composición bacteriana influya en los flujos de carbono y otros nutrientes del suelo (Frank *et al.*, 2003).

## **2.1. Filogenia de las bacterias del suelo**

Los géneros de bacterias del suelo tradicionalmente importantes, según estudios por técnicas dependientes de cultivo son: *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus* (5-45% de las colonias aisladas), *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Pseudomonas* (2-10%) y *Streptomyces* (23-30%). En los últimos 30 años esto ha cambiado debido a su revisión taxonómica (especialmente *Flavobacterium* y *Pseudomonas*) y a las técnicas independientes de cultivo que han permitido un censo más directo de las bacterias del suelo y que sugieren que esos 9 géneros representan solamente un 3% de las bacterias del suelo. De los 9, las *Pseudomonas* spp. son las más abundantes en las comunidades de bacterias del suelo, representando el 1,6% de las secuencias clonadas en diversos trabajos, que han sido revisados por Janssen (2006). En este estudio se analizaron 3,400 clones del dominio *Eubacteria* presentes en 32 bibliotecas de ARNr 16S, que componen comunidades microbianas del suelo de diferentes orígenes geográficos y tipos de vegetación. Entre 10-20% de las secuencias pudieron ser asignadas a géneros conocidos, mientras que la mayoría de las secuencias de ARNr 16S (80-90%) eran de bacterias no afiliadas a los géneros conocidos. Entre las secuencias de *Actinobacteridae* el número de bacterias afiliadas con géneros conocidos fue menos de la mitad. En el grupo de las *Gammaproteobacteria*, menos de la mitad de las secuencias pudo ser asignada a los géneros descritos, representando *Pseudomonas* el segundo más abundante (1,6% de las secuencias) luego de *Burkholderia* (2,7%).

El suelo parece estar dominado por 9 phyla pertenecientes al dominio *Eubacteria*, que representan en promedio el 92% de las bibliotecas de suelo, pero existen en total unos 52 phyla bacterianos (la mitad reconocidos en el Manual *Bergey's*). Los miembros del phylum *Proteobacteria* representaron en promedio un 40% de las bibliotecas derivadas de comunidades bacterianas del suelo. La mayoría de los miembros de este phylum pueden clasificarse en las clases *Alphaproteobacteria* (20%), *Betaproteobacteria* (10%), *Gammaproteobacteria* (8%) y *Deltaproteobacteria* (2%). Sólo un 20-35% de las secuencias pueden asignarse los 528 géneros descritos de este phylum (Janssen, 2006).

Los miembros del phylum *Actinobacteria* (antes denominados Actinomycetes o bacterias Gram(+)) con alto contenido en G+C; Fierer *et al.*, 2005) son en promedio un 13% (0-34%) de las comunidades bacterianas del suelo, representando por técnicas de cultivo una tercera parte de las colonias aisladas. Las 3 subclases de este phylum (*Actinobacteridae*, *Acidimicrobidae* y *Rubrobacteridae*) son comunes en el suelo. La mayoría de los géneros descritos pertenecen a la subclase *Actinobacteridae*, que consiste en 158 géneros, muchos de los cuales han sido bien estudiados; representan un 4-5% de los clones y 26-47% de las secuencias pueden asignarse a un género descrito. Las otras dos subclases han sido menos estudiadas; no hay hasta el momento miembros descritos de *Acidimicrobidae*, y sólo 2 géneros de *Rubrobacteridae* a partir de suelo. En general, hay muchos linajes sin representantes cultivados en las 3 subclases de actinobacteria que habitan el suelo, phylum que presenta alto grado de diversidad fenotípica (Janssen, 2006).

Los miembros del género *Bacillus* han sido considerados comunes en la comunidad bacteriana del suelo, pero la clase *Bacilli*, que incluye 79 géneros del phylum *Firmicutes* (comúnmente denominados Gram(+)) con bajo contenido en G+C; Fierer *et al.*, 2005), contribuyen con menos 2% de las bibliotecas. Es posible que miembros de este grupo estén subrepresentados en estudios que dependen de la extracción de ADN del suelo, dada la dificultad para lisar células y esporas, o pueden ser particularmente abundantes en algunos sitios, tales como en suelos de pradera de Holanda (Felske *et al.*, 2000). Dentro de este phylum, 17-52% de las secuencias pueden ser asignadas a géneros conocidos (Janssen, 2006).

Los miembros de los otros phylum representan en promedio 20% *Acidobacteria*, 7% *Verrucomicrobia*, 5% *Bacteroidetes*, 3% *Chloroflexi*, 2% *Planctomycetes*, 2% *Gemmatimonadetes*. Miembros del dominio *Archaea* han sido detectados en suelo pero su abundancia es generalmente baja (Janssen, 2006).

Existe considerable variabilidad en la abundancia de miembros de diferentes phyla y clases en diferentes suelos, evaluado por la abundancia de el ARNr 16S o de su gen en las bibliotecas. No se sabe en qué grado estas variaciones son en respuesta a condiciones del ambiente o artefactos inducidos por los métodos; la abundancia de diferentes grupos bacterianos puede estar afectada por un gran número de factores biológicos, químicos y físicos. El grado de variación fenotípica dentro de algunos grupos debe implicar que la abundancia total de un grupo particular puede no cambiar tanto como la representación de especies dentro de ese grupo, por lo que es esperable que la abundancia de grupos fenotípicamente tan diversos no esté controlada por una única variable (Janssen, 2006).

## **2.2. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal**

Los microorganismos influyen en la fertilidad de los suelos agrícolas, especialmente con respecto a la disponibilidad de nutrientes de las plantas y a la supresión de patógenos (Kennedy y Smith, 1995). La expresión del potencial supresivo para fitopatógenos dependerá de los determinantes abióticos y de la estructura de la comunidad microbiana del suelo. Asimismo, la supresividad contra patógenos está afectada por diferentes estrategias de manejo de suelos (van Elsas *et al.*, 2002).

La supresividad ha sido conceptualmente dividida en general y específica. La primera está asociada a comunidades, siendo generalmente desconocidos los microorganismos y los mecanismos responsables. La supresividad específica se debe a interacciones específicas entre fitopatógenos y uno o más antagonistas, por ejemplo, un productor de antibióticos o parásitos. Ciertos géneros bacterianos tales como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* y las actinobacterias se encuentran a menudo en altas poblaciones en suelos supresivos (van Bruggen y Semenov, 2000). Estos autores concluyen que existen claros paralelismos entre la búsqueda de indicadores de salud del suelo y la supresión de enfermedades.

Las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* han sido extensamente estudiadas como agentes de control biológico. Los mecanismos de acción que determinan su antagonismo contra patógenos incluyen: competencia por nutrientes, producción de antibióticos e inducción de resistencia en la planta. Alternativamente, cepas pertenecientes a estos géneros incrementan el crecimiento de la planta de otras formas: solubilizando nutrientes, fijando nitrógeno, liberando fitohormonas, disminuyendo el nivel de metales pesados en el suelo, por lo que se las incluye dentro del grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR<sup>1</sup>) (Kloepper, 1995). La producción de antibióticos en el suelo también se debe en gran medida a la presencia de actinobacterias. Estos organismos son especialmente importantes por su participación en el parasitismo y degradación de esporas de patógenos fúngicos (Whipps, 2001).

Estas bacterias están también involucradas en el ciclo de la material orgánica y algunas especies pueden fijar nitrógeno atmosférico en vida libre o en asociación con plantas no leguminosas. Además de su importancia ecológica y agrícola, miembros de estos taxones son de interés médico e industrial, debido a la producción de enzimas y metabolitos secundarios, a la degradación de compuestos xenobióticos y a que algunas especies son patógenas de plantas y animales, incluido el ser humano (Stach *et al.*, 2003; Thirup *et al.*, 2003; Schouten *et al.*, 2004).

---

<sup>1</sup> PGPR: del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

### 3. DIVERSIDAD MICROBIANA

Los organismos unicelulares han habitado la Tierra por más de 30 mil millones de años, 2-3 mil millones más que cualquier otro organismo (Hunter-Cevera, 1998; Kennedy, 1999). Las comunidades microbianas son extremadamente diversas. Su diversidad incluye la composición genética de los microorganismos, el ambiente o hábitat donde se encuentran y su rol ecológico o funcional dentro del ecosistema (Schinner *et al.*, 1996; Hunter-Cevera, 1998).

Actualmente existe una gran discrepancia entre las evaluaciones de la diversidad microbiana presente en ambientes naturales realizadas con diferentes técnicas. Estas discrepancias reflejan el estado fisiológico de las bacterias, las cuales pueden ser cultivadas bajo ciertas condiciones y desarrollarse en formas durmientes y probablemente no cultivables bajo otras condiciones ambientales. Sólo el 1% de las células observadas en una muestra por visualización directa con microscopio logra cultivarse. Una posibilidad es que las células no cultivables sean microorganismos filogenéticamente similares a los cultivables, pero en un estado fisiológico diferente (viables pero no cultivables). Otra hipótesis es que son filogenéticamente diferentes y no pueden ser cultivadas por los métodos estándar. El uso de técnicas moleculares y análisis filogenéticos basados en la secuencia del ADN ha aportado evidencia de esto último (Rondon *et al.*, 1999; Hunter-Cevera, 1998).

Los recientes progresos en ecología microbiana molecular muestran que el tamaño de la diversidad microbiana en la naturaleza es mucho mayor de lo que se pensaba (Rondon *et al.*, 1999). Las bacterias son una de las formas de vida más diversas y pueden comprender más de un millón de especies. Las estimaciones más conservadoras sugieren que son más de 110.000. Sólo una fracción de estas especies ha sido aislada e identificada, estimándose entre el 1-10 % (Kennedy, 1999; Hunter-Cevera, 1998, Schinner *et al.*, 1996).

El suelo representa uno de los hábitats más diversos para los microorganismos. Nuestro conocimiento de la diversidad microbiana del suelo es limitado, y los estudios realizados recientemente sugieren que existen grupos bacterianos importantes en el suelo sobre los cuales somos totalmente ignorantes. La naturaleza microscópica y la inmensa diversidad de las bacterias del suelo han impedido hasta ahora estudios precisos o abarcadores de las especies bacterianas presentes. Se ha estimado que en 1 gramo de suelo hay 4.000 “unidades genéticas” bacterianas diferentes, y que alrededor de 5.000 especies bacterianas han sido descritas. Como en otros hábitats, aproximadamente el 1% de la población bacteriana del suelo puede ser cultivada por métodos de laboratorio estándar y se desconoce si dicho porcentaje es representativo (Rondon *et al.*, 1999; Kuske *et al.*, 2002; Kirk *et al.*, 2004).

La distribución temporal y espacial de las bacterias son factores que aumentan aun más su diversidad. Dado su pequeño tamaño y la variabilidad espacial a pequeña escala en el suelo, se pueden desarrollar comunidades específicas de cada micrositio, aumentando la diversidad de un suelo dado. Esta heterogeneidad dentro de la matriz del suelo dificulta la obtención de información ecológicamente significativa, ya que la gran variación espacial entre réplicas puede enmascarar, por ejemplo, cambios debidos a diferencias en las prácticas agrícolas (Kennedy, 1999; Kuske *et al.*, 2002; McCaig *et al.*, 2001). Las áreas de descomposición de restos vegetales en el suelo son sitios de proliferación e intensa actividad microbiana, y agregan heterogeneidad al sistema suelo. La estructura de la comunidad en estos micrositios está afectada además por la composición química del material vegetal. La posición en el paisaje también afecta la distribución y diversidad de determinadas bacterias, y sus poblaciones y actividades disminuyen rápidamente con la profundidad. Esto último se debe probablemente al deterioro del sustrato, a la limitación de carbono, cambios en el nitrógeno, humedad, actividad y exudados de las raíces u otros cambios químicos o físicos del suelo (Kennedy, 1999; Schinner, 1996; Kuske *et al.*, 2002). La mayor proporción de la biomasa (50%) y de la actividad (40-70%) microbianas ha sido encontrada en los primeros 5 cm de suelo. Estos valores también varían en el tiempo, observándose registros máximos en verano y mínimos en invierno (Bardgett *et al.*, 1997). Sin embargo, los cambios permanentes en la actividad biológica del suelo conviene estudiarlos en primavera, y los efectos específicos de las plantas analizando muestras tomadas en otoño (Öhlinger, 1996; Kuske *et al.*, 2002).

Otro problema asociado con la medida de la diversidad microbiana del suelo es la dificultad para definir las especies microbianas. No existe definición oficial de especie bacteriana y se pueden encontrar varias definiciones diferentes. La definición de especie tradicional está basada en plantas superiores y animales y no se aplica fácilmente a procariotas. La diversidad de los procariotas se expresa generalmente en términos de fisiología y metabolismo, mientras que la de los eucariotas superiores en términos de estructura y comportamiento. La plasticidad genética de las bacterias, permitiendo la transferencia de ADN, dificulta aun más el concepto de especie (Kirk *et al.*, 2004; Hunter-Cevera, 1998).

La diversidad y actividad microbiana son parte integral de la función del ecosistema, más que su resultado. Se ha propuesto que la pérdida de especies bacterianas podría no cambiar el funcionamiento del ecosistema, los procesos biológicos o las transformaciones bioquímicas, debido a la redundancia en su actividad. Sin embargo, esta afirmación puede estar limitada al poco conocimiento que poseemos de las características de las bacterias cultivadas, el cual es un porcentaje pequeño de la población total. La redundancia en bacterias parece no ser importante, sino que puede existir un alto nivel de especialización en los sistemas bacterianos. Organismos funcionalmente similares pueden exhibir requerimientos de crecimiento y

sobrevivencia variados, y tolerar diferentes ambientes o hábitats. Poco se sabe sobre el grado y función de la diversidad microbiana en suelos, dado que la ecología microbiana ha sido separada tradicionalmente de la ecología general. Las funciones microbianas en los ecosistemas son tan diversas como los propios microorganismos, por lo que algunos microbiólogos creen que puede ser más útil examinar la diversidad funcional que la estructural (Kennedy, 1999; Hunter-Cevera, 1998).

### **3.1. Beneficios ambientales y económicos de la diversidad microbiana**

A lo largo de la historia, diversos microorganismos naturales han proporcionado importantes materiales biológicos útiles para el hombre. Durante los últimos 50 años, productos derivados de metabolitos secundarios microbianos han sido usados para satisfacer necesidades médicas, industriales y agrícolas (ej. antibióticos, anticancerígenos, compuestos antifúngicos, inmunosupresores y antiparasitarios, inhibidores de enzimas, herbicidas, insecticidas y promotores del crecimiento) (Rondon *et al.*, 1999).

Es difícil evaluar con precisión todos los beneficios ambientales y económicos que son resultado directo o indirecto de la diversidad microbiana. Para algunos, el concepto de “valor” de conservar la biodiversidad a nivel microbiano tiene poco significado. Otros han intentado hacer un cálculo económico parcial. Una función microbiana económica y ambientalmente importante es la fijación de nitrógeno, con un rendimiento mundial de  $140-170 \times 10^6$  ton/año lo que equivale a US\$ 90 mil millones. El uso mundial de la biorremediación como alternativa costaría US\$ 14 mil millones/año, contra los US\$ 135 mil millones que se gastan con los métodos convencionales. Se han estimado también los beneficios económicos de la diversidad microbiana relacionados a la disposición de residuos (más de US\$ 700 mil millones), a la formación del suelo y a la biotecnología. En este último campo, la diversidad microbiana ha dado muchos éxitos, tales como enzimas para biología molecular (US\$ 80 millones), detergentes (US\$ 600 millones) y diversas aplicaciones industriales (US\$ 1,6 mil millones) Un capítulo aparte sería considerar el valor en dólares de los productos naturales aislados de microorganismos\_(Hunter-Cevera, 1998).

### **3.2. Métodos para el estudio de la diversidad microbiana**

Los microorganismos son extremadamente difíciles de investigar en la naturaleza, debido a su pequeño tamaño y su simplicidad morfológica. Esto ha llevado al uso del cultivo para analizarlos, resultando en que algunos microorganismos han sido muy bien estudiados, pero la gran mayoría no lo ha sido. Los intentos actuales para describir y entender la diversidad

microbiana tienen como objetivo superar este sesgo para proveer una imagen más precisa de la diversidad microbiana y de su función en los ambientes naturales (Rondon *et al.*, 1999).

El método tradicional para determinar la diversidad microbiana ha sido identificar los organismos cultivables de un sistema a nivel de especies y usar diferencias taxonómicas para medir la diversidad. Más recientemente, se han usado unidades de especie basadas en atributos de funcionamiento o procesos, como la utilización de sustratos. También han sido usados análisis de componentes estructurales, como el análisis de ácidos grasos, para distinguir especies y diversidad. Aunque estas medidas pueden usarse para monitorear cambios en la estructura global de la comunidad, así como en subgrupos de la misma, no proveen información taxonómica. El análisis de ácidos nucleicos también puede ser usado para estimar la diversidad microbiana. La recuperación de información genética a partir del suelo permite determinar el número de organismos diferentes además de describir nuevas especies (Kennedy, 1999).

Los métodos para medir la diversidad microbiana en el suelo pueden clasificarse en dos grupos: bioquímicos y moleculares. Dentro de las técnicas bioquímicas se incluye el recuento en placas, el perfil fisiológico de la comunidad por utilización de sustratos y el análisis de FAME<sup>2</sup>. Tradicionalmente, la diversidad ha sido evaluada usando plaques selectivos y recuento directo de viables. Estos métodos son rápidos, baratos y pueden proveer información sobre el componente activo heterótrofo de la población. Sus limitaciones incluyen la dificultad para separar las bacterias de las partículas del suelo o biofilms, la selección de los medios y las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, luz) apropiados, la incapacidad para cultivar un gran número de bacterias con las técnicas actuales, la posibilidad de inhibición del crecimiento entre colonias y el potencial esparcimiento de las mismas. Además, el recuento en placa favorece aquellos microorganismos con altas tasas de crecimiento. Todas estas limitaciones pueden influir en la diversidad aparente de la comunidad microbiana (Kirk *et al.*, 2004). La relación entre los recuentos de viables y los recuentos directos por microscopía refleja la relación entre el número de células activas (en división) y las “células quiescentes”, y la mayoría de las bacterias del suelo están en esta última forma. Cualquier desviación de los parámetros ambientales originales durante el cultivo puede alterar la estructura de la comunidad, a través de la imposición de nuevas condiciones selectivas (Hunter-Cevera, 1998).

Para superar los problemas asociados a las bacterias no cultivables, se han desarrollado varios métodos para identificar y estudiar estos microorganismos incluyendo el análisis de ácidos grasos, ADN y ARN (Kirk *et al.*, 2004). Las técnicas basadas en ADN pueden proporcionar una medida amplia de la diversidad y de la composición de las comunidades bacterianas del suelo,

---

<sup>2</sup> FAME: metilésteres de los ácidos grasos (del inglés: fatty acid methyl ester)

dado que contempla tanto los miembros de la comunidad cultivables como los no cultivables, que son los que generalmente predominan (Kuske *et al.*, 2002). Por esto el uso de PCR<sup>3</sup>, que amplifica pequeñas cantidades de ADN y detecta microorganismos presentes en bajo número en el ambiente, es ventajoso para evaluar la diversidad microbiana (Hunter-Cevera, 1998).

La mayoría de los métodos para investigar la diversidad microbiana están basados en el análisis de la secuencia del gen del ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S o 18S para procariontes o eucariontes, respectivamente) ya que permite su identificación y la predicción de relaciones filogenéticas. Generalmente, se aísla el ADN de muestras ambientales y se amplifica por PCR el ADN blanco (por ej. parte del ARNr 16S) utilizando primers universales o específicos. Posteriormente, los productos resultantes se separan de varias formas, obteniéndose una “huella digital” (*fingerprinting*) de la comunidad (Rondon *et al.*, 1999; Kirk *et al.*, 2004).

Dos métodos de *fingerprinting* de comunidades frecuentemente usados son DGGE y TGGE<sup>4</sup>. Éstos separan moléculas con distinta secuencia de bases gracias a diferencias en sus propiedades de desnaturalización, que resultan en variaciones en la distancia de migración en gradientes químicos o de temperatura (McCaig *et al.*, 2001). Teóricamente, la DGGE puede separar moléculas de ADN con un par de bases de diferencia. Bandas específicas de DGGE pueden ser escindidas del gel, re-amplificadas y secuenciadas, para aportar más información sobre microorganismos específicos y grupos taxonómicos de la comunidad (Kirk *et al.*, 2004). Estos métodos permiten comparaciones rápidas, reproducibles y en cierto modo baratas, ya que varias muestras pueden ser analizadas simultáneamente. Son usados generalmente para detectar cambios en las poblaciones microbianas a lo largo del tiempo y/o bajo diferentes condiciones ambientales, y dado que son potencialmente capaces de detectar cambios a nivel de especie, se espera que detecten cambios menores en la estructura comunidad. Estas técnicas permiten además la cuantificación, comparando la presencia e intensidad relativa de bandas individuales en los geles para calcular índices de diversidad y realizar análisis de agrupamiento de los patrones de bandeo (McCaig *et al.*, 2001, Kirk *et al.*, 2004).

Típicamente, los estudios de diversidad microbiana incluyen la diversidad relativa de comunidades a lo largo de un gradiente de estrés, una perturbación u otra diferencia biótica o abiótica (Kirk *et al.*, 2004).

Utilizando diversas técnicas moleculares, Øvreås y Torsvik (1998) encontraron que la diferencia entre las poblaciones bacterianas de dos suelos agrícolas fue significativamente mayor cuando se analizó la comunidad total que mediante el estudio de la comunidad cultivable. Por lo tanto,

---

<sup>3</sup> PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction).

<sup>4</sup> DGGE y TGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante o de temperatura (del inglés: Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis).

concluyeron que el análisis de la diversidad microbiana debe incluir el ADN de toda la comunidad microbiana y no sólo el ADN de las bacterias cultivables.

Otros trabajos apoyan la hipótesis que las bacterias del suelo fácilmente cultivables pueden ser los principales contribuyentes al funcionamiento del ecosistema. El efecto de la contaminación por metales se observó sólo en patrones de DGGE a partir de bacterias cultivadas y no del ADN total de la comunidad. La porción cultivable de la comunidad microbiana es un parámetro ecológico importante, y es necesario evaluar su actividad, y no sólo la presencia o ausencia de sus integrantes (Ellis *et al.*, 2003).

Con las técnicas actuales es difícil estudiar la diversidad real, dado que no sabemos qué hay presente y no tenemos forma de determinar la precisión de nuestro método de extracción o detección. El mejor método a utilizar depende de las preguntas a contestar y de los recursos disponibles (Kirk *et al.*, 2004). Una tendencia interesante es la de usar múltiples métodos para analizar una muestra dada en la mayor cantidad de niveles posible, aportando una imagen más completa de la diversidad microbiana y una evaluación más global de los cambios en su estructura y función (Rondon *et al.*, 1999; Kirk *et al.*, 2004).

### **3.2.1. Índices de diversidad**

La biodiversidad es función de dos componentes: (1) la riqueza o abundancia, que es el número total de especies presentes, y (2) la equitatividad, que es la distribución de individuos entre esas especies. En la evaluación de la biodiversidad deben ser considerados ambos parámetros, aunque un índice de diversidad (un valor) no puede indicar el estado total de una comunidad (Kennedy, 1999; Kirk *et al.*, 2004).

Algunos índices de diversidad de uso común en ecología han sido aplicados en ecología microbiana molecular para describir las comunidades microbianas del suelo, tales como Shannon, dominancia y equitatividad (Kennedy, 1999; McCaig *et al.*, 2001).

La transformación de los datos de PCR-DGGE en valores numéricos como los índices, permite la integración de información sobre la diversidad bacteriana con otras variables del suelo. En el análisis de la calidad del suelo, el conocimiento sobre cuán diferente es la diversidad microbiana respecto a la situación original o de referencia es más importante que evaluar si un determinado uso del suelo causa un aumento o disminución de la diversidad microbiana. Esto es posible calculando valores como el IDM (impacto en la diversidad microbiana), que es una medida de cuánto se desvía la estructura de la comunidad microbiana de la situación original o de referencia (Aboim *et al.*, 2008).

#### 4. EFECTOS ANTROPOGÉNICOS SOBRE LA DIVERSIDAD MICROBIANA

Las perturbaciones humanas asociadas con la agricultura han emergido como una de las principales fuerzas que dan forma a la diversidad, estructura y productividad de los ecosistemas en todo el planeta (Vitousek *et al.*, 1997). Hasta ahora, mucho esfuerzo de investigación ha estado dirigido a entender cómo las prácticas agrícolas y de manejo del suelo influyen en la estructura y diversidad de las comunidades aéreas. Sin embargo, a medida que aumenta la conciencia sobre la importancia de los organismos del suelo en regular los procesos ecosistémicos, tales como ciclado de nutrientes y descomposición de la materia orgánica, aumentan los estudios de cómo los microorganismos responden a perturbaciones, especialmente a aquellas relacionados a la agricultura (Bardgett *et al.*, 2001).

El número y actividad de los microorganismos del suelo dependen de la presencia de plantas (composición de especies, cobertura del suelo, penetración de las raíces, restos vegetales, etc.), tipo de suelo, macro y microclima. Todo cambio en el sustrato o en las condiciones ambientales resulta en un cambio en la composición de especies y una modificación de la tasa metabólica (Schinner, 1996). Las comunidades bacterianas, en particular, tienen una dependencia importante del cultivo presente, puesto que la planta ejerce una selección específica mediante los exudados de la raíz (Latour *et al.*, 1996), siendo a veces, en ensayos de invernadero, el mayor determinante de la comunidad bacteriana (Miethling *et al.*, 2000; Wieland *et al.*, 2001). Los estudios dedicados a evaluar el rol de la diversidad de macrófitas sobre la estabilidad, resiliencia y funcionamiento de los ecosistemas asumen un acoplamiento entre la diversidad vegetal sobre el suelo y la diversidad microbiana bajo el mismo. En realidad, se ha asumido por mucho tiempo que las comunidades vegetales gobiernan la diversidad microbiana del suelo, pero poco se sabe sobre cómo la composición de especies vegetales y su diversidad influye en la composición de la comunidad de microorganismos del suelo. En algunos casos, sólo se observaron efectos de la diversidad vegetal sobre los perfiles de la comunidad bacteriana de la rizósfera, y no del resto del suelo. Estos resultados demuestran que el nivel de acoplamiento entre las comunidades de macrófitas y las microbianas está relacionado al grado de las interacciones involucradas (Kowalchuk *et al.*, 2002). Sin embargo, otros estudios mostraron que la influencia de las plantas sobre la comunidad microbiana del suelo se extiende más allá de la rizósfera, alterando el funcionamiento de la misma también en el resto del suelo (Kirk *et al.*, 2004).

La microflora del suelo es sensible, además, a disturbios producidos por el manejo agrícola, la contaminación ambiental y otros tipos de estrés (Kennedy, 1999; Schinner, 1996). La reducción en la diversidad vegetal que ocurre debido a disturbios tales como arado, sobrepastoreo y contaminantes, pueden disminuir también la diversidad microbiana (Kennedy, 1999).

Muchos estudios han examinado las consecuencias de perturbaciones naturales y antropogénicas sobre la microbiota del suelo, pero restringidas a los métodos ecológicos generales, que son limitados en su capacidad para describir un ecosistema en particular. Las poblaciones bacterianas y su respuesta a estreses han sido estudiadas en términos de enumeración de microorganismos, biomasa, tasas de respiración y actividades enzimáticas, prestando poca atención a las respuestas a nivel de la comunidad o de los organismos. Estas medidas a nivel de procesos -aunque son críticas para entender el ecosistema- pueden ser insensibles a cambios a nivel de comunidad, dada la redundancia de estas funciones dentro de un ecosistema. Dado que las comunidades bacterianas involucran interacciones complejas entre organismos diversos, deben ser estudiadas como tal, y no como una “caja negra” con entradas y salidas a determinadas tasas. Las técnicas moleculares basadas en el análisis del ARNr 16S permiten la evaluación rápida de la diversidad genética, lo que puede proporcionar un indicador más sensible y menos sesgado de cambios en las comunidades del suelo. Las comunidades bacterianas y sus procesos necesitan ser examinados no sólo en relación a los individuos que comprenden la comunidad, sino también observando el efecto de las perturbaciones o estreses ambientales sobre ellas (Griffiths *et al.*, 2003; Kennedy, 1999).

Existen algunos antecedentes sobre el efecto del manejo del suelo sobre las comunidades microbianas. Buckley y Schmidt (2003) reconocieron diferentes patrones en la estructura de comunidades microbianas en suelos con o sin historia reciente de cultivo. Se han encontrado claras diferencias en la estructura y en la diversidad fisiológica de varios grupos microbianos entre suelos bajo pasturas permanentes, monocultivos o sometidos a rotaciones (van Elsas *et al.*, 2002). En otro estudio, se observó que las técnicas de manejo agrícola (laboreo, laboreo mínimo o laboreo cero) impactaron la composición de la comunidad microbiana más que la cantidad de precipitaciones (Kirk *et al.*, 2004). Sin embargo, no se detectaron diferencias entre la estructura de la comunidad bacteriana de rizósfera de maíz en tratamientos bajo siembra directa o en suelos arados (Schmalenberger y Tebbe, 2003).

En nuestro país existen varios estudios sobre las propiedades físicas y químicas del suelo en diferentes agroecosistemas, y su relación con la calidad del mismo (García y Morón, 1992; Morón y Sawchick, 2002). Sin embargo, la información sobre la composición de las comunidades edáficas, sus interrelaciones y su relación con la calidad del suelo es muy escasa. Recientemente, se han realizado algunas evaluaciones sobre los cambios estructurales y funcionales de comunidades microbianas edáficas provocados por los cambios en el uso del suelo. La comparación entre calidad de suelo bajo plantaciones de *Eucalyptus* spp. con más de 20 años y bajo praderas naturales mostró que la biomasa microbiana se mantiene aunque la estructura ecosistémica sea diferente, incrementándose la representación

de hongos y los mecanismos oxidativos (Carrasco, 2003). Estudios similares realizados por Sicardi *et al.* (2003) mostraron diferencias en la respiración del suelo, el coeficiente de mineralización de carbono y actividades enzimáticas, resultando estas últimas buenos indicadores de calidad de suelo. Pereyra *et al.* (2003) evaluaron el efecto de la siembra directa o en cobertura y el uso de herbicidas sobre indicadores biológicos de la calidad de suelo, en un ensayo con 2 años de antigüedad y observaron que el potencial de inóculo de hongos endomicorrícicos fue estimulado por ambos sistemas de labranza. Por otra parte, existen estudios sobre la composición de la comunidad microbiana y su actividad metabólica en cultivos de arroz, que se enfocan en las bacterias del ciclo del nitrógeno y oxidantes de metano, combinando métodos moleculares y dependientes de cultivo (Fernández *et al.*, 2003; Ferrando y Tarlera, 2003).

La resiliencia de un ecosistema para amortiguar los efectos de perturbaciones extremas puede depender en parte de la diversidad en interacciones del sistema. Los resultados de un estudio del efecto de la contaminación por mercurio sobre la diversidad y funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo apoyan la hipótesis de que una menor diversidad disminuye la estabilidad del ecosistema y por lo tanto su funcionamiento. La tasa de extinción de especies dentro de un sistema puede ser un indicador importante del estado del mismo y puede ser crítica para determinar el nivel de diversidad necesario para mantener un agroecosistema. La diversidad bacteriana puede describir el estado de la comunidad bacteriana y su respuesta a disturbios naturales o humanos. Los índices de diversidad bacteriana podrían funcionar como bioindicadores de la estabilidad de una comunidad. Sin embargo, la ausencia de información detallada sobre la composición de especies bacterianas del suelo limita el mayor uso de estos índices (Kennedy, 1999).

Aunque muchas actividades antropogénicas, tales como el desarrollo de las ciudades, la agricultura, el uso de pesticidas y la contaminación pueden potencialmente afectar la diversidad microbiana del suelo, no se sabe cómo los cambios en ésta pueden influir en los ecosistemas (Kirk *et al.*, 2004). Comprender el efecto de estos disturbios sobre la diversidad bacteriana del suelo y su funcionamiento podría contribuir enormemente a la comprensión de la calidad del suelo y al desarrollo de agroecosistemas sustentables (Kennedy, 1999).

## 5. CONSIDERACIONES FINALES

Desde 1992, 142 países han ratificado la Convención sobre Diversidad Biológica y han estado de acuerdo en promover la conservación y utilización sustentable de la diversidad biológica, y compartir equitativamente sus beneficios. Se ha hecho mucho énfasis en la necesidad de ampliar nuestro conocimiento de las especies vegetales y animales del planeta. Sin embargo, poco interés se ha vertido en los microorganismos, a pesar del enorme impacto y del rol que cumplen en nuestra vida diaria, desde mantener la biósfera hasta mejorar nuestra forma de vida (Hunter-Cevera, 1998).

La biodiversidad confiere estabilidad y resiliencia a los ecosistemas. Es necesario determinar el nivel de diversidad bacteriana, la composición de especies y su distribución, para mantener la resiliencia y la resistencia a estreses. Es preciso reconocer la importancia de la diversidad bacteriana del suelo y de su rol en los ecosistemas (Kennedy, 1999).

Poco se sabe sobre la composición de las comunidades naturales de bacterias en suelos de praderas o sobre cómo su actividad y diversidad responden a perturbaciones. Algunos autores advierten que cambios en la diversidad microbiana de un hábitat pueden no implicar efectos deletéreos, por lo que necesitamos aprender cómo los cambios en la estructura de la comunidad influyen en su función. Este tema requiere especial atención en ecosistemas amenazados, tales como las praderas, debido a su importancia en el ciclo global del carbono y la producción agrícola (Kuske *et al.*, 2002; Griffiths *et al.*, 2003; Kirk *et al.*, 2004).

La evaluación de la sustentabilidad en los sistemas de producción plantea la necesidad de cuantificar y comprender las relaciones e interrelaciones entre las variables químicas, físicas y biológicas, así como también disponer de indicadores que permitan determinar la calidad/salud del suelo (Doran y Zeiss, 2000). La biota del suelo y su actividad tienen un gran potencial para ser utilizados como indicadores biológicos, debido a que los organismos responden al manejo del suelo en una escala temporal apropiada (Blair *et al.*, 1996). Medidas de abundancia, diversidad o actividad biológica podrían ser indicadores útiles de la calidad del suelo (Linden *et al.*, 1994). Muchos microorganismos cumplen algunas de las premisas básicas para ser utilizados como indicadores. La determinación de la sensibilidad de éstos a cambios en el manejo del suelo, su correlación con las funciones benéficas del mismo, y el significado de lo que indicarán, así como el valor de la información que éstos arrojen acerca de los cambios del ambiente, son necesarias para la utilización óptima de los microorganismos como indicadores de calidad/salud del suelo. Sólo profundizando en el conocimiento de las interrelaciones entre los componentes del suelo, incluyendo los bióticos, se podrá explicar y alertar sobre el impacto ambiental a largo plazo que tendrá el manejo de los suelos (Díaz, 2003).

## OBJETIVOS

---

### GENERAL

Determinar la influencia del pastoreo bovino sobre la estructura de la comunidad bacteriana en un suelo de pradera, y su relación con otros componentes bióticos y abióticos del suelo.

### ESPECÍFICOS

1. Evaluar en un suelo de pradera natural, con y sin pastoreo bovino:
  - a. la abundancia de bacterias cultivables heterótrofas, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp. y actinobacterias.
  - b. la diversidad genética de bacterias del suelo.
2. Determinar la relación entre la comunidad bacteriana y las propiedades físicas y químicas del suelo, en una pradera con y sin pastoreo.

### HIPÓTESIS:

---

El pastoreo bovino modifica la estructura de la comunidad bacteriana del suelo de pradera, alterando su abundancia y diversidad.



Se tomaron muestras en parcelas de 0,5 ha que presentan (figura 2):

- Pradera natural con ganado vacuno, realizando pastoreo rotativo (14 días de pastoreo seguidos de 42 días de descanso, resultando en 90 días de pastoreo al año con una carga animal de 0,75-0,80 unidades de ganado/ha).
- Pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1994.
- Pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1984.



**Figura 2.** Aspecto de las parcelas donde se realizaron los muestreos, en primavera de 2004. Pradera natural con pastoreo (foto izquierda); Exclusión desde 1994 (foto inferior izquierda); exclusión desde 1984 (foto inferior).



Se realizaron 4 muestreos: en primavera de 2004, otoño y primavera de 2005 y otoño de 2006 (fechas: 14/09/2004, 31/03/2005, 28/09/2005, 21/06/2006).

De cada parcela se tomaron 5 muestras compuestas por 15 tomas de suelo al azar, realizadas con calador (diámetro 2 cm) a partir de la superficie (0-10 cm). Las muestras fueron secadas al aire a 20°C (en caso de ser necesario), tamizadas por malla de 2 mm para su homogenización y conservadas a 4°C y -80°C.

## 2) Recuentos bacterianos

En todas las muestras (conservadas a 4°C) se determinó el número de bacterias viables pertenecientes a diferentes grupos. Para esto se suspendieron 5 g de suelo en 45 ml de pirofosfato de sodio 0.1% estéril y se agitaron a 150 rpm durante 30 minutos. Se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en gota para heterótrofos (por triplicado) y en superficie para los restantes (por duplicado) en placas de los siguientes medios:

**Heterótrofos:** medio Tryptic Soy Agar 1/10 Difco® (TSA 1/10) suplementado con cicloheximida 100 µg/ml (Smit *et al.*, 2001).

***Pseudomonas fluorescentes:*** medio King's B (KB, King *et al.*, 1954) suplementado con ampicilina 50 µg/ml, cloramfenicol 12,5 µg/ml y cicloheximida 100 µg/ml (Geels y Schippers, 1983).

***Bacillus spp. (recuento de esporas):*** medio TSA 1/10, incubando previamente las diluciones de suelo a 85 °C durante 30 minutos (Stevenson y Segner, 1992).

**Actinobacterias:** medio Starch Casein Agar (SCA) suplementado con cicloheximida 100 µg/ml (Leoni y Ghini, 2003).

Todas las placas se incubaron en estufa a 25 °C y se determinó el número de colonias a las 48 h (heterótrofos, *Pseudomonas* y *Bacillus*) o a los 7 días (actinobacterias).

**2.1. Humedad.** Se determinó el porcentaje de humedad de cada muestra secando 10 g de suelo en estufa a 100 °C durante 48 h, para expresar los resultados como UFC/g de suelo seco (Frioni, 2006).

## 3) Análisis molecular

La estructura de la comunidad microbiana se evaluó por DGGE de fragmentos del gen del ARN ribosomal 16S, directamente a partir del ADN extraído de muestras de suelo conservadas a -80°C. Se utilizaron 3 repeticiones por tratamiento, obtenidas en primavera de 2004 y otoño de 2005.

**3.1. Extracción de ADN.** El ADN presente en cada muestra se obtuvo a partir de 0.5 g de suelo utilizando el kit FastDNA SPIN for Soil (Q-Biogene). El ADN obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa 0.8% con buffer TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM; pH 8) 0.5X, a 80 V por 1 h (Sambrook *et al.*, 1989). Además se estimó por espectrofotometría su concentración y pureza, midiendo la absorbancia a 260, 280 y 320 nm (longitudes de onda con máximos de absorbancia para ácidos nucleicos, proteínas y ácidos húmicos, respectivamente).

**3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction).** Se realizaron amplificaciones del ADNr 16S a partir del ADN purificado, utilizando cebadores específicos para *Eubacteria*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Actinobacteria* (tabla 1). En el caso de los PCRs específicos de género se utilizó un PCR semi-nested, empleando una dilución del primer producto como molde para la segunda reacción. Los productos de PCR se analizaron primero en geles de agarosa 1% en TBE 0.5X (100 V, 45 min) y luego por DGGE.

**Tabla 1.** Cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

GRUPO	1ª reacción	2ª reacción	Referencias
<i>Eubacteria</i>	F968f-GC y R1401	----	Nübel et al., 1996
<i>Pseudomonas</i> spp.	Ps-f y Ps-r	F968f-GC y Ps-r	Widmer et al., 1998 Evans et al., 2004
<i>Bacillus</i>	BacF y R1401	F968f-GC y R1401	Garbeva et al., 2003
<i>Actinobacteria</i>	F243 y R1401	F968f-GC y R1401	Heuer et al., 1997

GC: grampa en 5' con secuencia rica en GC (Muyzer et al., 1993)

Las reacciones de PCR fueron realizadas de la siguiente forma:

**Eubacteria.** La mezcla de reacción se preparó con 1 µl de una dilución 1/5 del ADN purificado (10-50 ng), 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 10 pmol de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 5 µg de seroalbúmina bovina (BSA), formamida 1%, 2.5 U de *Taq* polimerasa y *Taq* buffer 1X en un volumen total de 50 µl. El programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min (adaptado de Peixoto et al., 2002).

**Pseudomonas spp.** La mezcla para ambas reacciones contenía 1 µl de solución de ADN, 0.2 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 5 µg de BSA, formamida 1%, 2.5 U de *Taq* polimerasa y *Taq* buffer 1X en un volumen total de 50 µl. En la primer reacción se utilizó una dilución 1/5 del ADN purificado (10-50 ng) y el programa consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 65°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 10 min. En la segunda reacción se usó el producto de la primera sin diluir o diluido 10, 20 o 100 veces según la amplificación obtenida y el programa consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 62°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min (adaptado de Evans et al., 2004).

**Bacillus spp.** La mezcla para la primera reacción contenía 1 µl de una dilución 1/5 del ADN purificado (10-50 ng), 0.2 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 3.75 mM, 5 µg de BSA, formamida 1%, 5 U de *Taq* polimerasa y *Taq* buffer 1X en un volumen total de 50 µl. El programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 65°C por 90 s y extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min. La segunda reacción fue igual que la realizada para *Eubacteria*, con una dilución 1/100 del producto de la primera reacción (adaptado de Garbeva *et al.*, 2003).

**Actinobacteria.** La mezcla para la primera reacción se preparó con 1 µl de una dilución 1/5 del ADN purificado (10-50 ng), 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 2.5 pmol de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 2.5 µg de seroalbúmina bovina (BSA), formamida 1%, 2.5 U de *Taq* polimerasa y *Taq* buffer 1X en un volumen total de 25 µl. El programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 63°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min. La segunda reacción fue igual que la realizada para *Eubacteria*, con una dilución 1/100 del producto de la primera reacción (adaptado de Heuer *et al.*, 1997).

**3.3. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).** Los productos de PCR se analizaron por DGGE en un equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). Los geles de poliacrilamida contenían un gradiente lineal de agentes desnaturalizantes, diferente según el grupo bacteriano a analizar (ver tabla 2). La corrida electroforética se realizó a 60°C utilizando buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 9; Sambrook *et al.*, 1989) 1X y en las condiciones especificadas en la tabla 2. Como marcador de la migración se utilizó una mezcla de amplicones del ADNr 16S obtenidos con los cebadores de *Eubacteria* a partir de ADN de las cepas *Pseudomonas* sp. SVGG17, *Gluconoacetobacter* sp., *Serratia* sp. C16, *Bacillus liqueniformis* y *Rhodococcus* sp. Q (LEMM, UFRJ). Los geles se revelaron con SYBRgreen y fotografiaron bajo luz UV. Las imágenes obtenidas se analizaron como se describe en el punto 4.

**Tabla 2.** Condiciones para la separación de los productos de PCR por DGGE.

GRUPO	% de agentes desnaturalizantes en el gradiente*	Acrilamida (%)	Condiciones de electroforesis	Referencias
<i>Eubacteria</i>	40 - 70	6 - 9	70 V, 16 h	Peixoto <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas</i> spp.	50 - 70	6	70 V, 16 h	Evans <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus</i> spp.	45 - 65	6 - 9	100 V, 15 h	Garbeva <i>et al.</i> , 2003

\*100% de agentes desnaturalizantes: urea 7M y formamida 40% (v/v), previamente desionizada con la resina AG® 501-X8 (Bio-Rad).

## 4) Análisis de datos

**4.1. Recuentos bacterianos.** Los datos obtenidos de los recuentos fueron convertidos según el porcentaje de humedad de cada muestra para poder expresarse como unidades formadoras de colonias (UFC)/g suelo seco, según las siguientes fórmulas (Froni, 2006):

$$\text{UFC/g suelo seco} = \text{UFC/g suelo fresco} \times h$$

$$\text{Factor de corrección de la humedad (h): } h = \frac{100 + H\%}{100}$$

$$\text{Porcentaje de humedad (H\%): } H\% = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PS}} \times 100$$

PF: Peso Fresco  
PS: Peso Seco

Estos valores fueron transformados a  $\log_{10}$  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 las poblaciones se compararon por ANOVA 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.

**4.2. DGGE.** Los patrones de bandas de los geles de DGGE fueron analizados con el programa ImageQuant 5.2, descartándose las bandas que representaran menos del 1% de la sumatoria de la intensidad de las bandas de cada carril. Se construyeron matrices binarias de presencia y ausencia de bandas y se realizaron análisis de agrupamiento con el programa Statistica 5.0. Se utilizó el coeficiente de Pearson para determinar la distancia métrica y el algoritmo UPGA (Unweighted Pair-Group Average) para construir los dendogramas.

**4.3. Impacto sobre la Diversidad Microbiana (IDM).** Para poder dar un valor cuantitativo a los resultados de DGGE y así poder integrar en un análisis multivariado, se calculó el IDM desarrollado por Aboim *et al.* (2008). El IDM consiste en la distancia métrica de Pearson entre el patrón de bandas del tratamiento evaluado y el patrón de la muestra de referencia. Para normalizar los valores entre 0 (menor impacto) y 1 (mayor impacto), se divide la distancia entre cada tratamiento y la referencia, por el mayor valor de distancia obtenido. Como referencia se utilizaron las muestras de las exclusiones de pastoreo, y se calculó el IDM84 (respecto a la exclusión de 1984) y el IDM94 (respecto a la exclusión de 1994).

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 las poblaciones se compararon por ANOVA 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.

**4.4. Análisis de correlaciones.** Utilizando el programa Statistica 5.0 se generó una matriz de correlación de Pearson entre las variables microbiológicas estudiadas y variables fisicoquímicas del suelo. Los datos de abundancia de los grupos bacterianos fueron previamente transformados ( $\log_{10}$ ) y se utilizaron los valores medios de las variables para cada tratamiento y estación de muestreo, previamente estandarizados<sup>1</sup>. Se consideraron significativas las correlaciones con  $p < 0,05$ .

Los análisis fisicoquímicos fueron realizados por el Laboratorio de Análisis de Suelos de INIA-La Estanzuela, a partir de una muestra por parcela compuesta de 45 tomas de suelo de 0 a 10 cm de profundidad. Se realizaron las siguientes determinaciones: pH (en agua); carbono orgánico (Tinsley); nitrógeno total (Kjeldhal); contenido de bases: Ca y Mg, (acetato de amonio pH 7 y absorción atómica), K y Na (acetato de amonio pH 7 y emisión atómica) y textura (Bouyoucos). También se integraron en los análisis valores de densidad aparente y humedad (determinados en 3 puntos por parcela) y de peso seco del rastrojo (muestra compuesta de los residuos vegetales presentes en 15 cuadrados de 25x25 cm); gentilmente cedidos por Stella Zerbino (INIA-La Estanzuela).

**4.5. Análisis multivariados.** Para evaluar las interacciones entre las variables biológicas, físicas y químicas del suelo se seleccionó el análisis de componentes principales (ACP) que utiliza el método de ordenación lineal, a partir de los valores del gradiente de recambio de las variables en un análisis DCA (Detrended Correspondence Analysis) según ter Braak y Smilauer (1998). Se incluyeron las mismas variables que en el análisis de correlaciones y se estandarizaron<sup>1</sup> los datos de la matriz utilizada. Se utilizó el programa Canoco 4.0.

Luego de realizar un ACP con las variables fisicoquímicas, se correlacionaron los valores de las muestras en los primeros 2 ejes (valores de contribución de cada muestra a la formación del eje 1 y 2 –scores-) con las variables microbiológicas, mediante una prueba de correlación no paramétrica de Spearman (nivel de significancia  $p < 0.05$ ). Se utilizó el programa Statistica 6.0.

---

<sup>1</sup> (valor-media)/desvío estándar

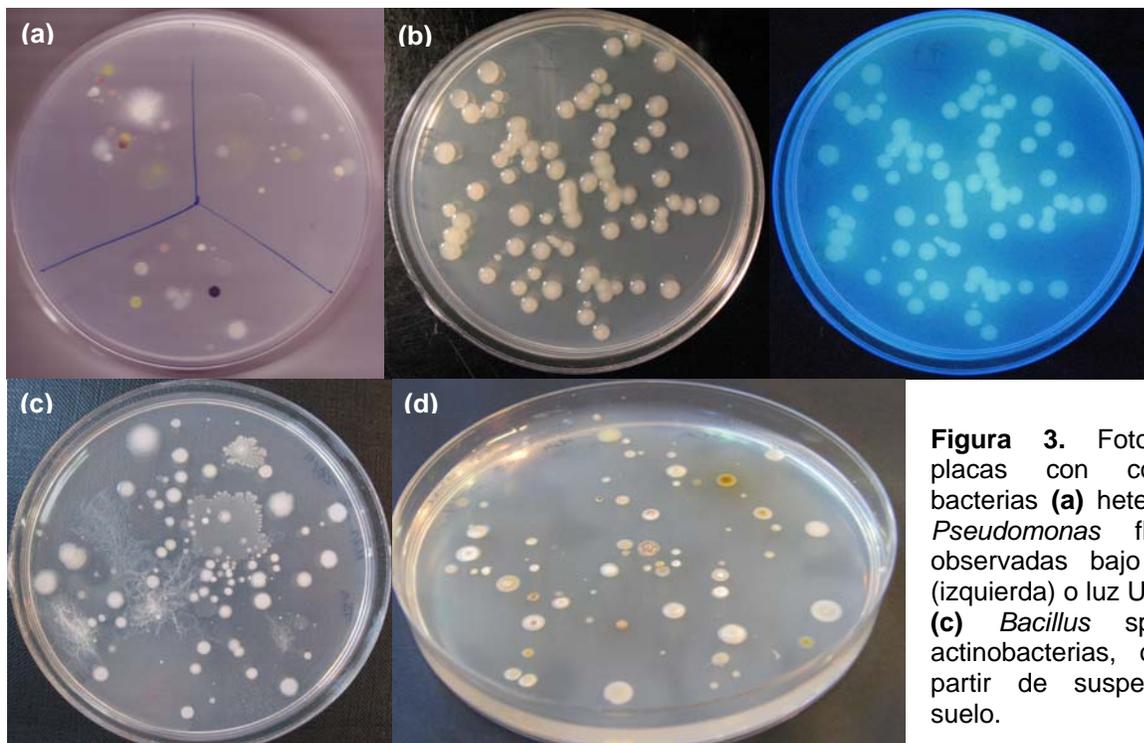
# RESULTADOS

---

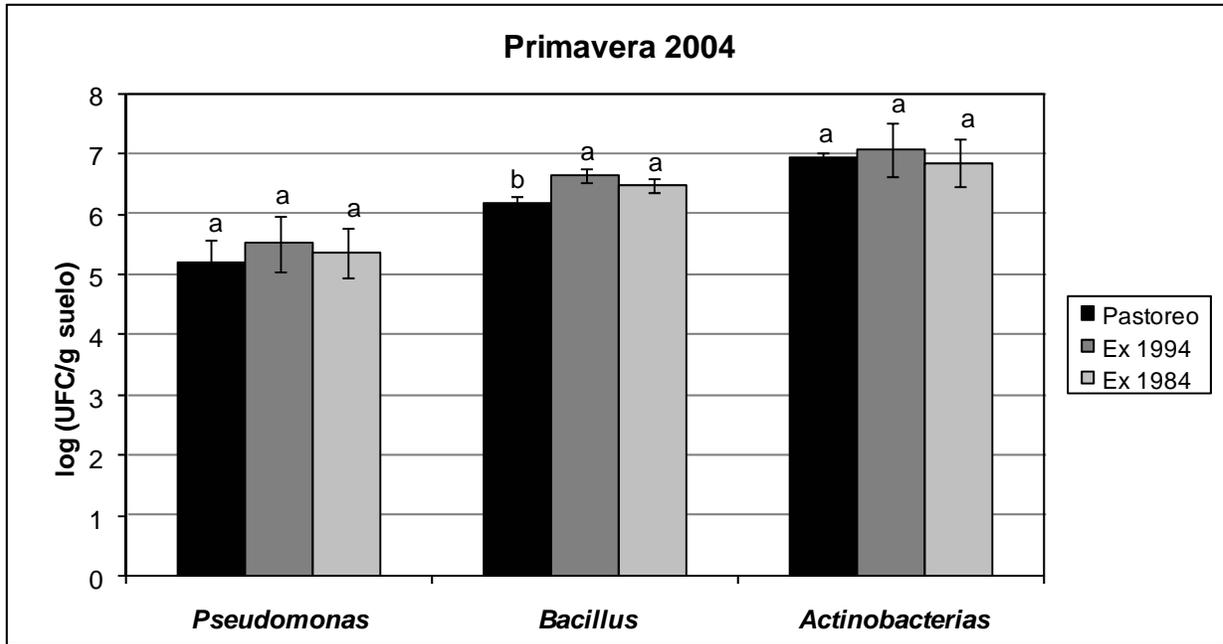
## 1. Abundancia de bacterias cultivables en un suelo de pradera con o sin pastoreo.

Se realizó el estudio de la comunidad bacteriana cultivable mediante recuentos de las poblaciones de heterótrofos, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp. y actinobacterias en las muestras de suelo (figura 3). El número de bacterias determinado para cada grupo se encontró siempre en el mismo orden, registrándose valores de  $10^7$  para heterótrofos,  $10^6$ - $10^7$  para actinobacterias,  $10^6$  para *Bacillus* spp. y  $10^5$  para *Pseudomonas* (figuras 4 a 7). El recuento de heterótrofos se realizó solamente en las 2 últimas estaciones de muestreo, cuando se hubo ajustado adecuadamente la técnica para este grupo.

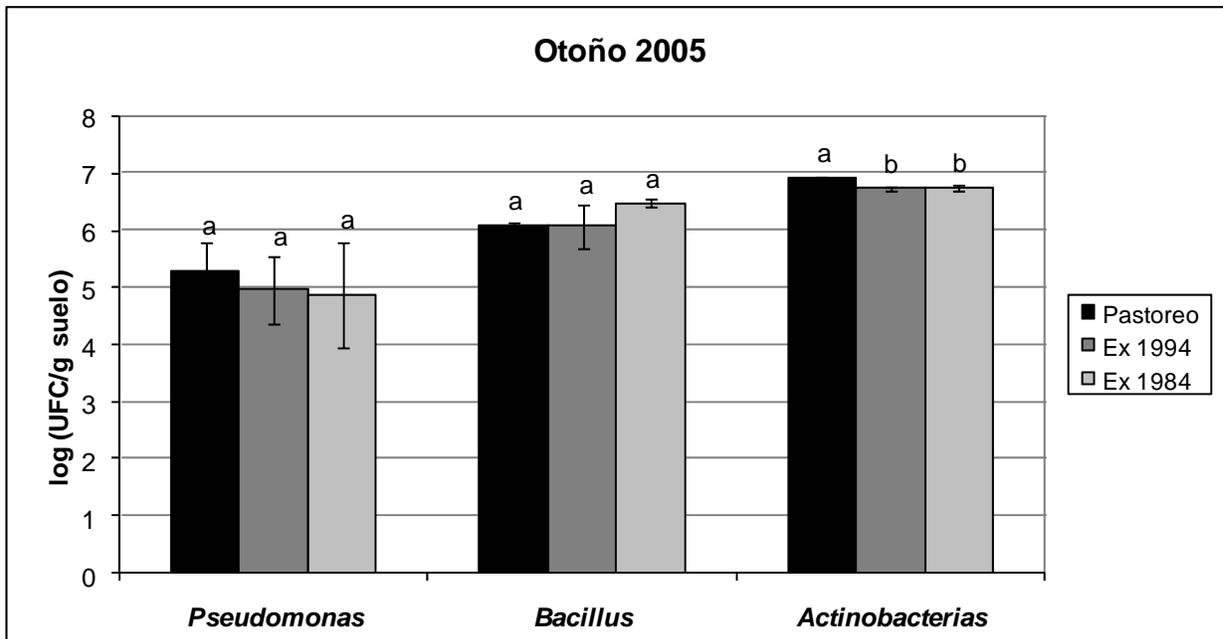
La respuesta más consistente a la exclusión de pastoreo fue la disminución de la población de actinobacterias, la cual se observó en 3 de las 4 estaciones muestreadas (figuras 5 a 7). El grupo de *Bacillus* spp. mostró diferencias entre los tratamientos en 2 estaciones, pero la respuesta al pastoreo no fue consistente (figuras 4 y 7). En las *Pseudomonas* fluorescentes sólo se observó una diferencia significativa en el último muestreo, mostrando menor abundancia en la parcela con pastoreo, y mayor número en la exclusión más reciente (figura 7).



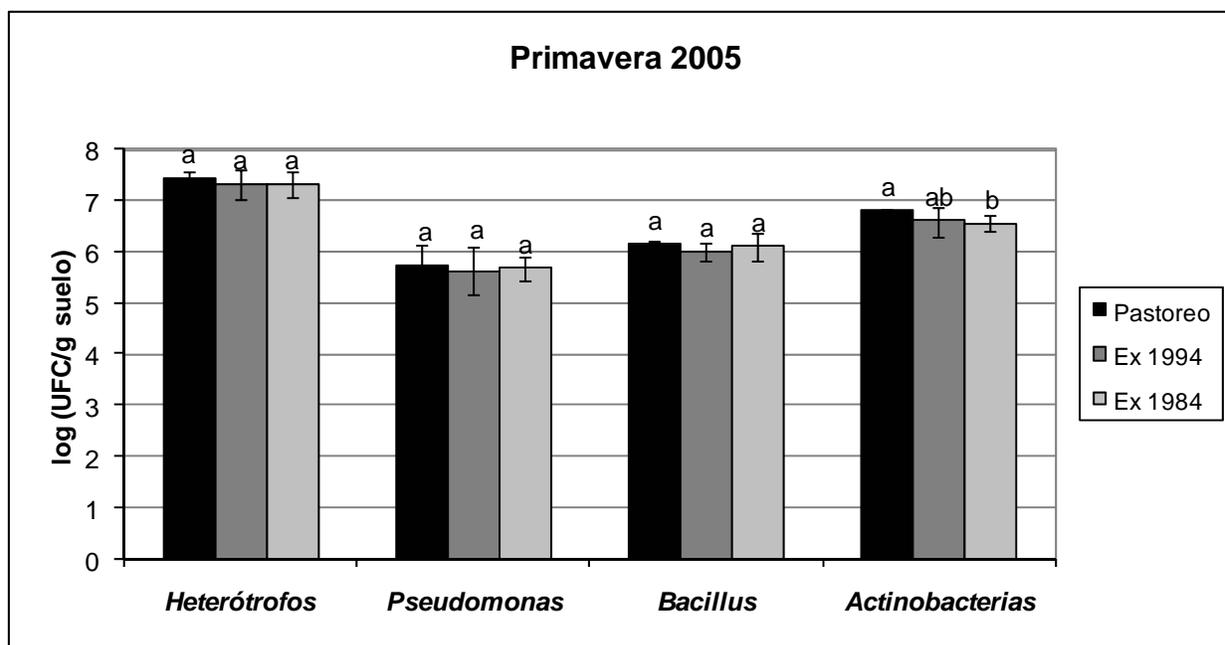
**Figura 3.** Fotografías de placas con colonias de bacterias **(a)** heterótrofas, **(b)** *Pseudomonas* fluorescentes observadas bajo luz visible (izquierda) o luz UV (derecha), **(c)** *Bacillus* spp. y **(d)** actinobacterias, obtenidas a partir de suspensiones de suelo.



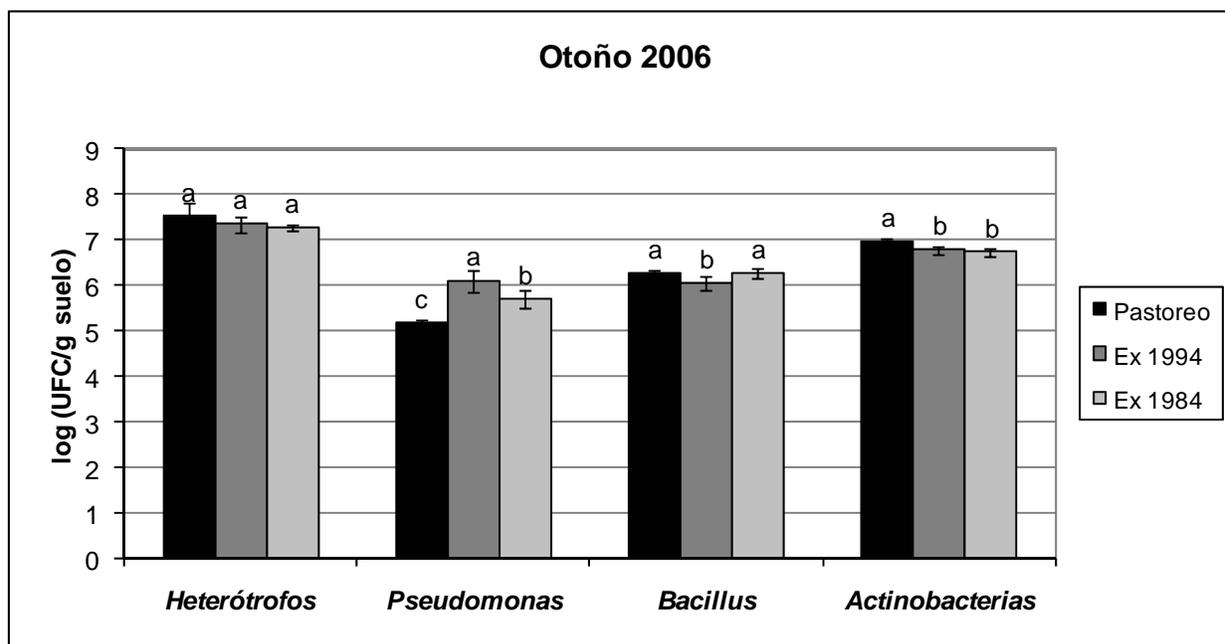
**Figura 4.** Abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp. y actinobacterias en las muestras de primavera de 2004, expresada como logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco. Valores medios de 5 repeticiones; se muestra el desvío estándar; letras diferentes en cada grupo de barras representan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Pastoreo: pradera natural sometida a pastoreo bovino; Ex 1994: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1994; Ex 1984: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1984.



**Figura 5.** Abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp. y actinobacterias en las muestras de otoño de 2005, expresada como logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco. Valores medios de 4 repeticiones; se muestra el desvío estándar; letras diferentes en cada grupo de barras representan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Pastoreo: pradera natural sometida a pastoreo bovino; Ex 1994: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1994; Ex 1984: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1984.



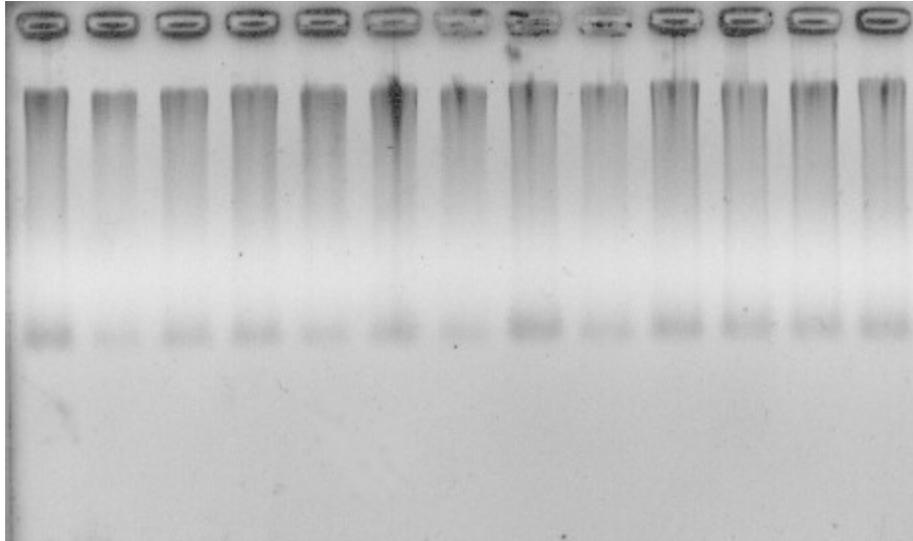
**Figura 6.** Abundancia de bacterias heterótrofas, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp. y actinobacterias en las muestras de primavera de 2005, expresada como logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco. Valores medios de 5 repeticiones; se muestra el desvío estándar; letras diferentes en cada grupo de barras representan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Pastoreo: pradera natural sometida a pastoreo bovino; Ex 1994: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1994; Ex 1984: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1984.



**Figura 7.** Abundancia de bacterias heterótrofas, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp. y actinobacterias en las muestras de otoño de 2006, expresada como logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco. Valores medios de 5 repeticiones; se muestra el desvío estándar; letras diferentes en cada grupo de barras representan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Pastoreo: pradera natural sometida a pastoreo bovino; Ex 1994: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1994; Ex 1984: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1984.

## 2. Caracterización de la diversidad bacteriana molecular en un suelo de pradera con o sin pastoreo.

La estructura de la comunidad bacteriana se analizó utilizando una metodología independiente de cultivo. En una primera etapa se extrajo el ADN presente en las muestras de suelo, utilizando un kit comercial (figura 8). Se verificó que el ADN obtenido era de tamaño, concentración y pureza apropiados para ser utilizado en reacciones de PCR.

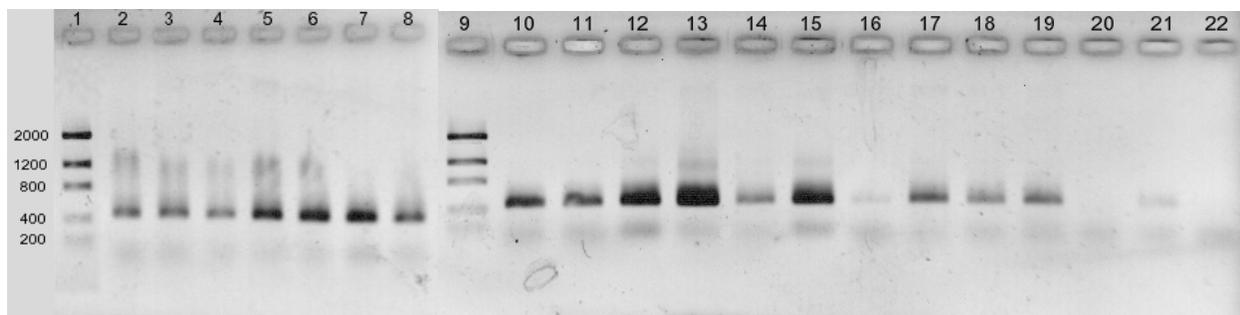


**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa de algunas de las extracciones de ADN a partir de muestras de suelo.

Con el ADN purificado se realizó el análisis por PCR-DGGE del dominio *Eubacteria* y del género *Pseudomonas*, y se intentaron ajustar las condiciones de PCR para el género *Bacillus* y la clase *Actinobacteria*.

### 2.1. Diversidad del dominio *Eubacteria*

Se realizaron reacciones de PCR a partir de diluciones del ADN extraído, utilizando cebadores específicos para la región V6-V8 del ARNr 16S, que se unen a las bases 968-984 y 1385-1401 del gen (posiciones correspondientes al ADNr de *E. coli*). Se obtuvo una banda de 473 pb (correspondiente a los 433 pb amplificados por los cebadores más 40 pb de la grampa GC), observándose gran variabilidad en la amplificación obtenida para las diferentes muestras (figura 9).

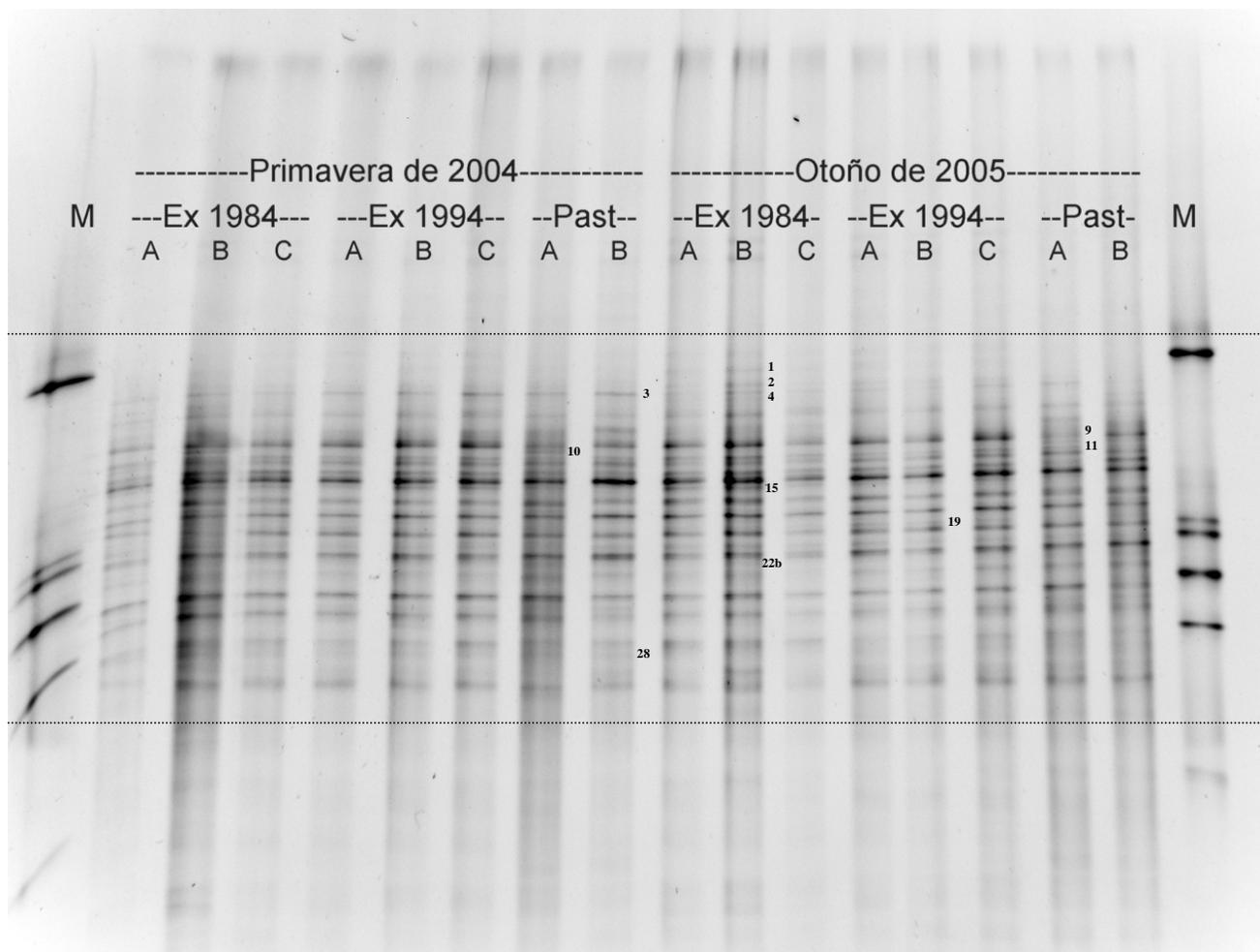


**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para *Eubacteria*. **1**-Marcador de peso molecular (pb) Low Mass DNA Ladder (Invitrogen); **2**-Ex1984 Prim04(A); **3**-Ex1994 Prim04(C); **4**-Past Prim04(B); **5**-Ex1984 Ot05(B); **6**-Ex1994 Ot05(C); **7**-Past Ot05(A); **8**-Ex1984 Prim04(C); **9**-Marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen); **10**-Ex1994 Prim04(B); **11**-Ex1994 Ot05(A); **12**-Past Ot05 (B); **13**-Ex1984 Prim04 (B); **14**-Ex1994 Prim04(A); **15**-Past Prim04 (A); **16**-Past Prim04(C); **17**-Ex1984 Ot05(A); **18**-Ex1984 Ot05(C); **19**-Ex1994 Ot05(B); **20**-Past Ot05(C) ADN molde dil. 1/5; **21**-Past Ot05(C) ADN molde sin diluir; **22**-control negativo de la reacción.

Los productos de PCR se separaron por DGGE, sembrando diferentes volúmenes de cada muestra para igualar la cantidad de ADN por carril. Las muestras correspondientes a la repetición (C) de pradera con pastoreo no fueron incluidas por haberse obtenido una amplificación insuficiente en el PCR (carriles 16, 20 y 21 en la figura 9).

Se observó una alta diversidad genotípica indicada por el gran número de bandas (más de 30). Por inspección visual se observaron algunas diferencias entre los distintos carriles, relacionadas a la estación de muestreo, al pastoreo o a cuestiones técnicas (figura 10):

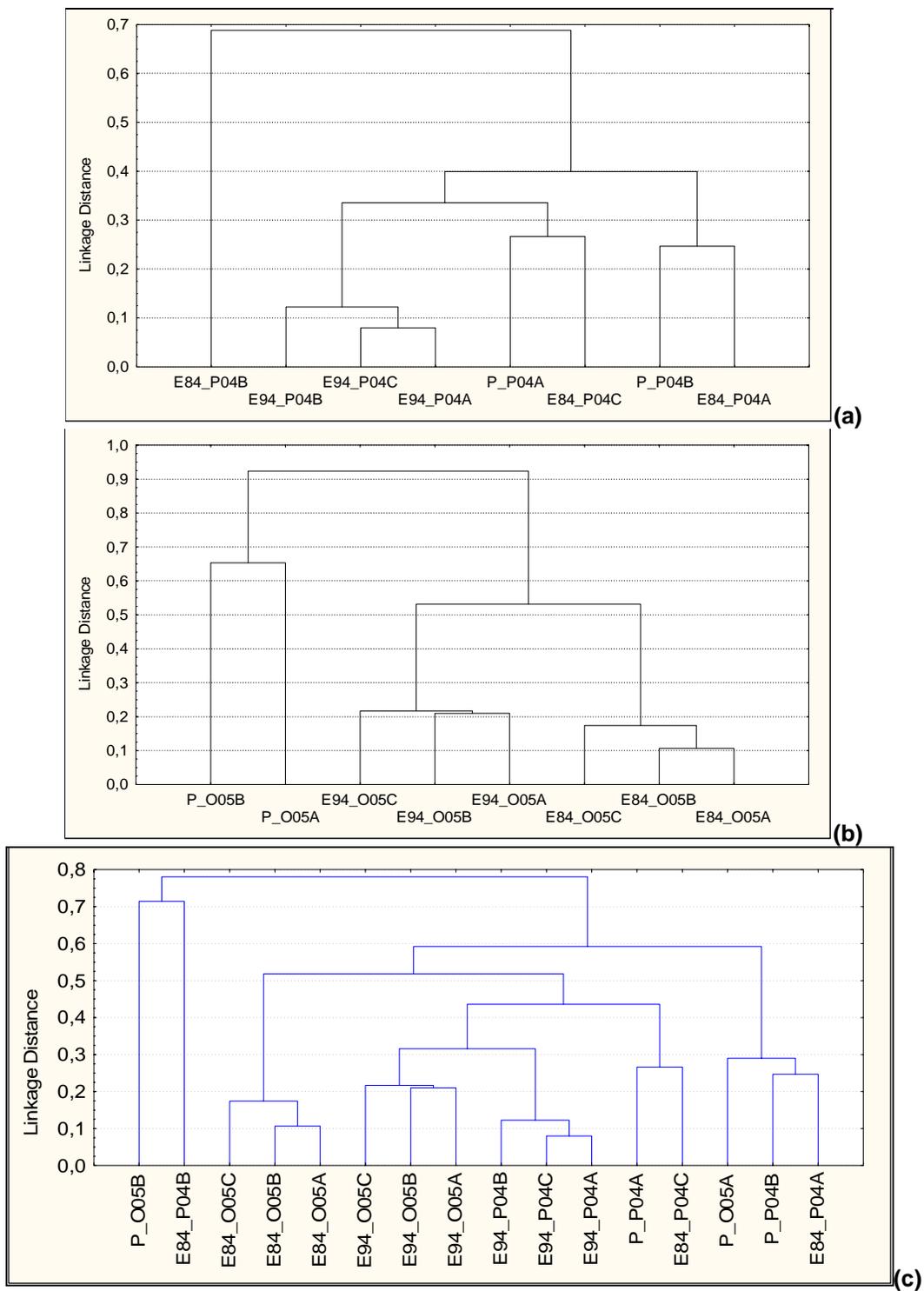
- en las muestras de primavera hay un promedio de 21 bandas por carril (con excepción de Ex 1984B, que presenta 27), mientras que en las de otoño hay en promedio 24.
- las bandas 1, 2 y fueron más frecuentes en las muestras de otoño
- la banda 3 resultó más intensa en primavera
- la intensidad relativa de las bandas 9 y 11 fue menor en las muestras con pastoreo
- la banda 10 se presentó en 3 de las 4 muestras de pradera natural con pastoreo, y en sólo 1 muestra de las 12 restantes (Ex 1984, primavera 2004).
- la banda 15 no se observó en ninguna de las muestras con pastoreo
- la banda 19 y dos bandas superiores que no fueron incluidas en el análisis se observaron principalmente en otoño
- la 22b en carriles con más cantidad de ADN
- la banda 28 está ausente en las 3 muestras correspondientes la exclusión más antigua tomadas en otoño. En todas estas muestras se observó la banda 4.



**Figura 10.** Gel de DGGE de los productos de PCR para *Eubacteria*. M: marcador de migración; Ex 1984: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1984; Ex 1994: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1994; Past: pradera natural sometida a pastoreo bovino. A, B y C son repeticiones de los tratamientos. El análisis de los patrones de banda se realizó entre las líneas punteadas indicadas en la figura. Los números indican las bandas diferenciales que se observaron entre los carriles (ver texto).

Se analizó la zona central del gel, donde se observaron bandas nítidas. Con el patrón obtenido se construyó una matriz binaria basada en la presencia o ausencia de bandas, y se realizó un análisis de agrupamiento que se presenta en forma de dendograma (figura 11).

En primavera de 2004, las tres muestras de la exclusión desde 1994 formaron un grupo con un 12% de similitud. El resto de las muestras no se agruparon de acuerdo al tratamiento, y una de las repeticiones de la exclusión desde 1984 (B) resultó muy diferente a las demás, diferenciándose en un 69% (figura 11a). Sin embargo, en otoño de 2005 se observaron 3 claros agrupamientos de las muestras de acuerdo al tratamiento, con similitudes de 17, 22 y 65% para la exclusión de 1984, la de 1994 y la pradera con pastoreo, respectivamente (figura 11b).



**Figura 11.** Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad de *Eubacteria* en pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1984 (E84), pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1994 (E94) y pradera natural sometida a pastoreo bovino (P). Se analizaron muestras obtenidas en primavera de 2004 (P04) (a), otoño de 2005 (O05) (b) y las de las 2 estaciones combinadas (c). A, B y C son repeticiones de los tratamientos.

Se analizaron también las muestras de las 2 estaciones combinadas, observándose que las correspondientes a la exclusión desde 1994 formaron 2 grupos con un 30% de similitud, donde se separan las muestras de primavera y otoño, con un 10 y 20% de similitud dentro de cada grupo, respectivamente. Las muestras de otoño de la exclusión desde 1984 también se agruparon con un 20% de similitud, diferenciándose en al menos un 50% del resto de las muestras. En los otros 3 grupos se mezclan las muestras de la exclusión desde 1984 de primavera y de pastoreo de las 2 estaciones (figura 11c).

### 2.1.1. Impacto del pastoreo sobre la diversidad de *Eubacteria*

Se calculó el índice de impacto en la diversidad microbiana (IDM) a partir de las distancias de Pearson de la matriz generada con los perfiles de bandas obtenidas en el DGGE para *Eubacteria*. Como referencia se utilizaron las muestras de las exclusiones de pastoreo, y se calculó el IDM84 (respecto a la exclusión de 1984) y el IDM94 (respecto a la exclusión de 1994) (tabla 3).

En primavera de 2004 las tres repeticiones de la exclusión de 1984 presentaron patrones de bandas variables, por lo que no se pudo calcular el IDM84. Considerando el IDM94 calculado por esta estación, el impacto en la diversidad microbiana en la exclusión más antigua fue mayor que en la pradera con pastoreo, y sólo se observaron diferencias significativas entre las exclusiones.

En otoño de 2005 sí se pudieron calcular los dos índices dado la mayor reproducibilidad de los patrones de bandas. El impacto del pastoreo fue alrededor de 0,9 con ambos índices, siendo intermedio el valor de IDM de la otra exclusión, y las diferencias fueron significativas en todos los casos.

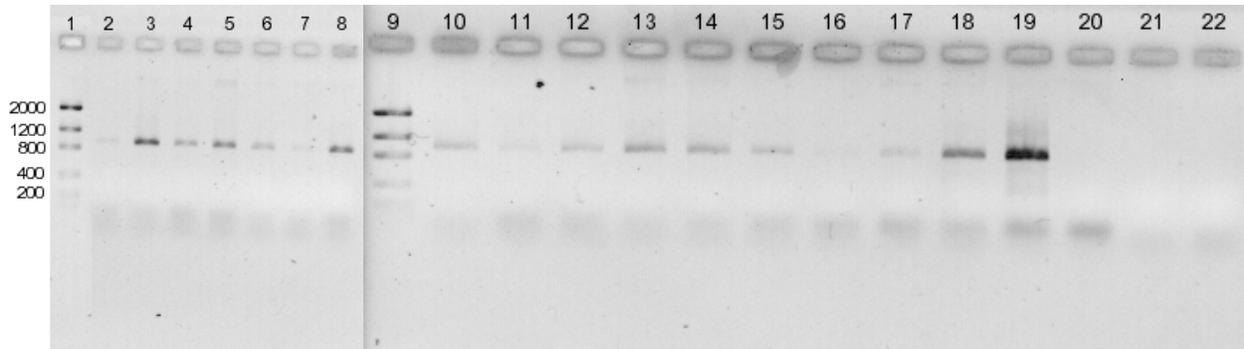
**Tabla 3.** Índices de impacto en la diversidad microbiana (IDM) del dominio *Eubacteria* (IDM84: con referencia a la exclusión de pastoreo desde 1984; IDM94: con referencia a la exclusión de pastoreo desde 1994).

	IDM84	IDM94
<b>Primavera de 2004</b>		
Exclusión de 1984	-	0,71 a $\pm$ 0,26
Exclusión de 1994	-	0,17 b $\pm$ 0,05
Pastoreo	-	0,52 ab $\pm$ 0,00
<b>Otoño de 2005</b>		
Exclusión de 1984	0,13 c $\pm$ 0,03	0,61 b $\pm$ 0,14
Exclusión de 1994	0,45 b $\pm$ 0,10	0,24 c $\pm$ 0,01
Pastoreo	0,88 a $\pm$ 0,17	0,90 a $\pm$ 0,07

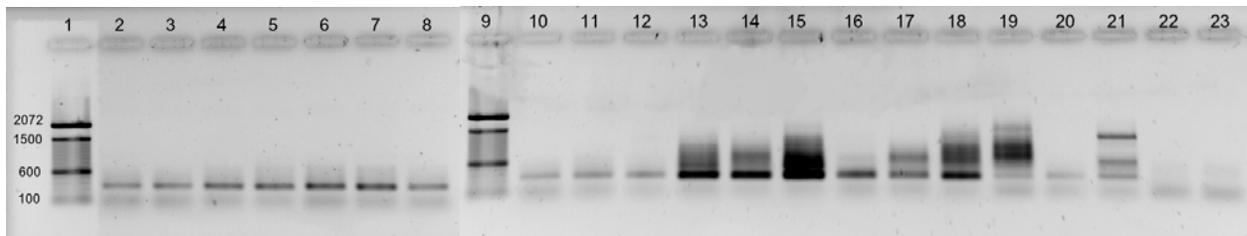
IDM =  $d_i/d_{max}$ ; donde  $d_i$  = distancia métrica de Pearson entre el tratamiento  $i$  y el tratamiento referencia,  $d_{max}$  = mayor valor de distancia obtenido entre un tratamiento y la referencia. Valores medios de 2 o 3 repeticiones; letras diferentes en cada índice o estación representan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ );  $\pm$  desvío estándar.

## 2.2. Diversidad del género *Pseudomonas*

Se realizaron reacciones de PCR semi-nested, para amplificar la región V6-V7 del ADNr 16S. En un primer paso -con cebadores específicos para el género- se obtuvieron bandas de 990 pb (figura 12) y en el segundo paso -con un cebador específico y otro universal conteniendo una grampa GC- se amplificaron fragmentos de 300 pb (figura 13). Aunque en algunos casos en el primer paso se obtuvo una amplificación muy débil, se obtuvo buena cantidad de producto en el segundo paso. Para algunas muestras la segunda reacción mostró bandas de amplificación inespecíficas.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para *Pseudomonas* (primer paso). **1-**Marcador de peso molecular (pb) Low Mass DNA Ladder (Invitrogen); **2-**Ex1984 Prim04(A); **3-**Ex1994 Prim04(C); **4-**Past Prim04(B); **5-**Ex1984 Ot05(B); **6-**Ex1994 Ot05(C); **7-**Past Ot05(A); **8-**Ex1984 Prim04(C); **9-**Marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen); **10-**Ex1994 Prim04(B); **11-**Ex1994 Ot05(A); **12-**Past Ot05 (B); **13-**Ex1984 Prim04 (B); **14-**Ex1994 Prim04(A); **15-**Past Prim04 (A); **16-**Past Prim04(C); **17-**Ex1984 Ot05(A); **18-**Ex1984 Ot05(C); **19-**Ex1994 Ot05(B); **20-**Past Ot05(C) ADN molde dil. 1/5; **21-**Past Ot05(C) ADN molde sin diluir; **22-**control negativo de la reacción.

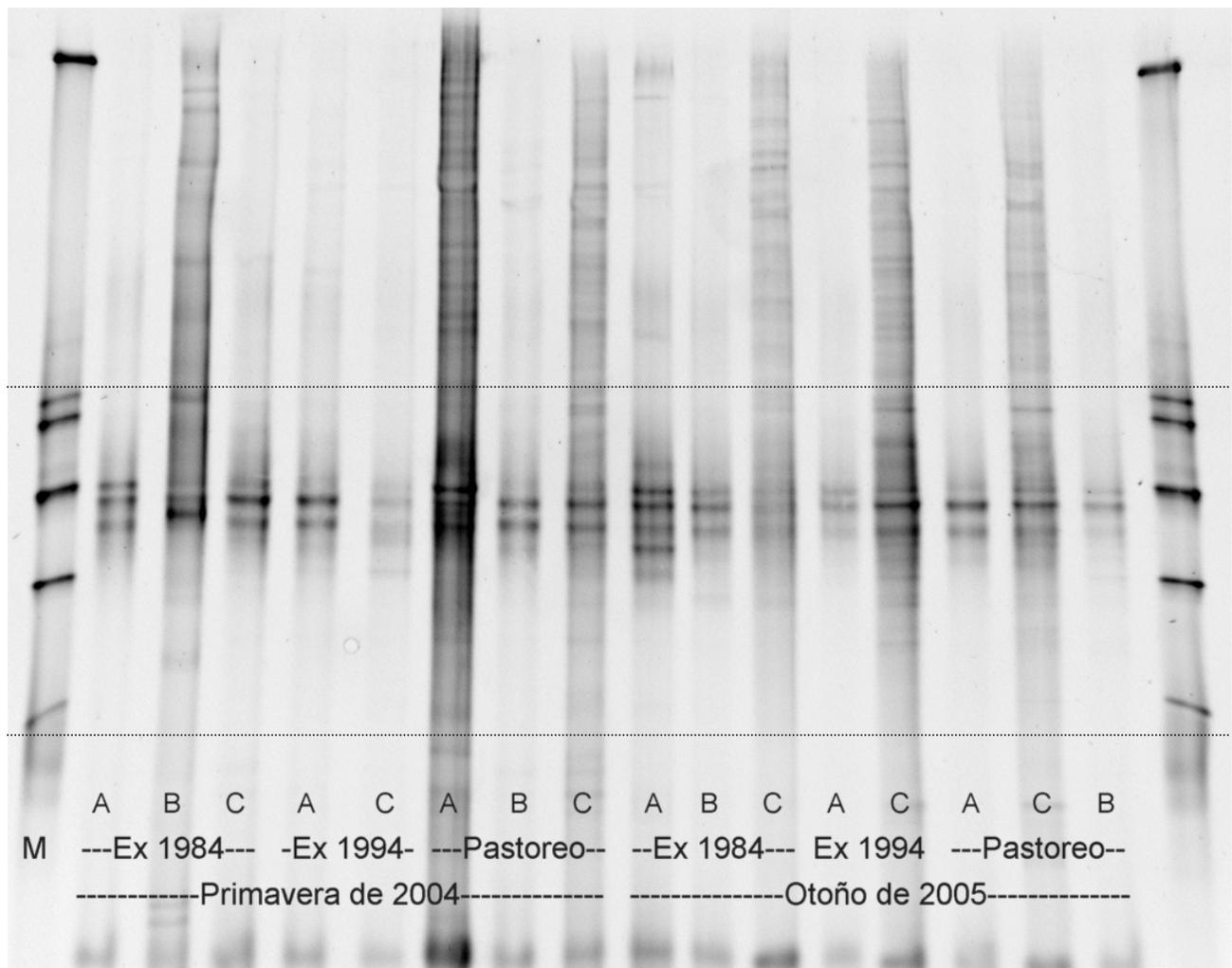


**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa de productos del segundo paso de PCR para *Pseudomonas*. **1-**Marcador de peso molecular (pb) 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); **2-**Ex1984 Prim04(A); **3-**Ex1994 Prim04(C); **4-**Past Prim04(B); **5-**Ex1984 Ot05(B); **6-**Ex1994 Ot05(C); **7-**Past Ot05(A); **8-**Ex1984 Prim04(C); **9-**Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); **10-**Ex1994 Prim04(B); **11-**Ex1994 Ot05(A); **12-**Past Ot05 (B); **13-**Ex1984 Prim04 (B); **14-**Ex1994 Prim04(A); **15-**Past Prim04(A); **16-**Past Prim04(C); **17-**Ex1984 Ot05(A); **18-**Ex1984 Ot05(C); **19-**Ex1994 Ot05(B); **20-**Past Ot05(C) ADN molde dil. 1/5; **21-**Past Ot05(C) ADN molde sin diluir; **22-**control negativo del PCR nested; **23-**control negativo de esta reacción.

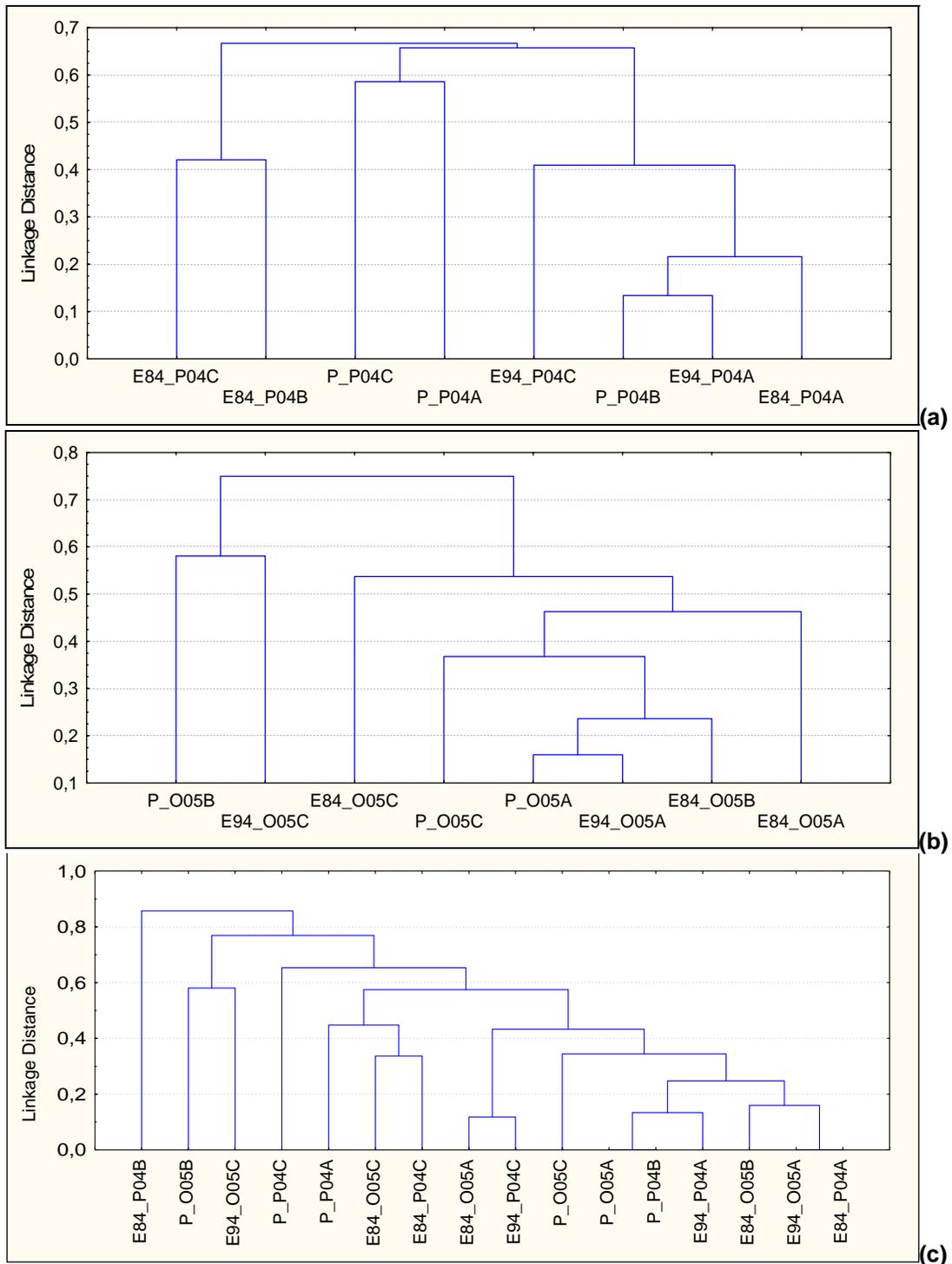
Los productos de PCR del segundo paso se separaron por DGGE, sembrando diferentes volúmenes de cada muestra para igualar la cantidad de ADN por carril. Las muestras correspondientes a la repetición (B) de la exclusión desde 1994 no fueron incluidas por haberse

obtenido poca amplificación o bandas inespecíficas de mayor intensidad que la banda esperada (carril 19 en la figura 13).

Se analizó la zona central del gel, donde se observaron bandas más intensas (figura 14). Con el patrón obtenido se construyó una matriz binaria basada en la presencia o ausencia de bandas, y se realizó un análisis de agrupamiento que se presenta en forma de dendograma (figura 15). En primavera, 2 de los triplicados de la exclusión desde 1984 y de la pradera con pastoreo formaron grupos diferenciados. Sin embargo, la tercera réplica de estos tratamientos se mezcló con la exclusión desde 1994 en el dendograma. No se observó ningún otro patrón de agrupamiento relacionado con el pastoreo o la estación de muestreo.



**Figura 14.** Gel de DGGE de los productos de PCR para *Pseudomonas*. M: marcador de migración; Ex 1984: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1984; Ex 1994: pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1994; Pastoreo: pradera natural sometida a pastoreo bovino. A, B y C son repeticiones de los tratamientos. El análisis de los patrones de banda se realizó entre las líneas punteadas indicadas en la figura.



**Figura 15.** Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad de *Pseudomonas* en pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1984 (E84), pradera natural con exclusión de pastoreo desde 1994 (E94) y pradera natural sometida a pastoreo bovino (P). Se analizaron muestras obtenidas en primavera de 2004 (P04) **(a)**, otoño de 2005 (O05) **(b)** y las de las 2 estaciones combinadas **(c)**. A, B y C son repeticiones de los tratamientos.

### **2.3. Diversidad de *Bacillus* spp. y *Actinobacteria***

Se realizaron reacciones de PCR semi-nested, para amplificar la región 5' del ADNr 16S de *Bacillus* spp. En un primer paso -con un cebador específico para este grupo y otro universal- se obtuvieron bandas de 1300 pb y en el segundo paso –con los cebadores para *Eubacteria*- se amplificaron fragmentos de 473 pb. Además de la banda esperada, en ambos pasos se obtuvo cierto ruido de fondo. Cuando se analizaron los productos por DGGE, las bandas obtenidas no resultaron nítidas, lo que no permitió analizar los patrones de bandas. Algo similar ocurrió en la amplificación del ADNr 16S de *Actinobacteria* (datos no mostrados).

### 3. Relaciones entre variables microbiológicas, físicas y químicas del suelo.

En la tabla 4 se resumen los resultados de las variables microbiológicas determinadas en este trabajo en 2 estaciones de muestreo y en la tabla 5 se presentan los datos para las variables físicas y químicas de suelo que fueron medidas en las mismas parcelas y estaciones de muestreo.

**Tabla 4.** Valores promedio de las variables microbiológicas medidas en este trabajo, en primavera de 2004 y otoño de 2005.

	<i>Pseudomonas</i> (ufc/g suelo)	<i>Bacillus spp.</i> (ufc/g suelo)	Actinobacterias (ufc/g suelo)	IDM84	IDM94
<b>Ex 1984 - P04</b>	$3,3 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	-	0,71
<b>Ex 1994 - P04</b>	$5,2 \times 10^5$	$4,7 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$	-	0,17
<b>Pastoreo - P04</b>	$2,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$	-	0,52
<b>Ex 1984 - Ot05</b>	$2,3 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	0,13	0,61
<b>Ex 1994 - Ot05</b>	$1,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	0,45	0,24
<b>Pastoreo - Ot05</b>	$3,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$	0,88	0,90

**Variables:** abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp. y actinobacterias; índices de impacto en la diversidad microbiana del dominio *Eubacteria* (IDM84: con referencia a la exclusión de pastoreo desde 1984; IDM94: con referencia a la exclusión de pastoreo desde 1994). **Ex 1984:** exclusión de pastoreo desde 1984; **Ex 1994:** exclusión de pastoreo desde 1994; **Pastoreo:** pradera natural sometida a pastoreo bovino; **P04:** primavera de 2004; **Ot05:** otoño de 2005.

**Tabla 5.** Variables físicas y químicas determinadas en las mismas parcelas utilizadas en este estudio, en primavera de 2004 y otoño de 2005.

	pH	COrg (%)	N (%)	Ca (meq/100g)	Mg (meq/100g)	K (meq/100g)	Na (meq/100g)	residuo (g)	humedad (%)	DensApa (g/cm <sup>3</sup> )	arena (%)	limo (%)	arcilla (%)
<b>Ex 1984 -P04</b>	5,9	3,30	0,30	15,2	5,7	0,30	0,10	67,7	36,5	1,09	35	32	33
<b>Ex 1994 -P04</b>	5,9	3,90	0,30	16,7	6,1	0,40	0,20	73,6	36,1	1,02	28	37	35
<b>Pastoreo-P04</b>	5,8	5,00	0,40	21,4	7,7	0,40	0,40	74,6	45,9	1,00	24	36	40
<b>Ex 1984 -Ot05</b>	6,1	3,88	0,34	13,9	5,6	0,33	0,13	151,5	38,6	1,15	35	32	33
<b>Ex 1994 -Ot05</b>	6,0	4,04	0,20	20,7	7,7	0,34	0,14	156,5	39,6	1,10	28	37	35
<b>Pastoreo-Ot05</b>	6,1	5,47	0,45	20,0	7,9	0,44	0,20	90,3	48,0	1,01	24	36	40

**Variables:** pH; COrg.: carbono orgánico; N: nitrógeno total; contenido de bases: Ca, Mg, K y Na; residuo: peso seco del rastrojo; humedad del suelo; DensApa: densidad aparente; textura: cantidad de arena, limo y arcilla. **Ex 1984:** exclusión de pastoreo desde 1984; **Ex 1994:** exclusión de pastoreo desde 1994; **Pastoreo:** pradera natural sometida a pastoreo bovino; **P04:** primavera de 2004; **Ot05:** otoño de 2005.

### 3.1. Correlaciones entre variables

Se estudiaron las correlaciones entre las variables, tanto microbiológicas como fisicoquímicas del suelo, considerando los datos de las estaciones de muestreo primavera de 2004 y otoño de 2005 (tabla 6).

**Tabla 6.** Matriz de correlación de Pearson entre todas las variables medidas en primavera de 2004 y otoño de 2005.

	pH	COrg	N	Ca	Mg	K	Na	RESIDUO	HUMEDAD	DENSAPA	ARENA	LIMO	ARCILLA	PSEUDO	BAC	ACTINO	IDM94
pH	1																
COrg	0,139	1															
N	0,101	0,742	1														
Ca	-0,254	0,716	0,153	1													
Mg	-0,020	0,808	0,252	0,969	1												
K	0,021	0,865	0,657	0,579	0,624	1											
Na	-0,581	0,651	0,512	0,640	0,541	0,612	1										
RESIDUO	0,633	-0,134	-0,452	-0,062	0,044	-0,343	-0,399	1									
HUMEDAD	0,122	0,962	0,743	0,714	0,812	0,708	0,621	-0,116	1								
DENSAPA	0,512	-0,648	-0,543	-0,617	-0,542	-0,813	-0,744	0,750	-0,555	1							
ARENA	0,199	-0,857	-0,419	-0,894	-0,882	-0,878	-0,729	0,257	-0,762	0,826	1						
LIMO	-0,209	0,504	-0,068	0,779	0,719	0,685	0,462	-0,068	0,340	-0,631	-0,849	1					
ARCILLA	-0,154	0,953	0,696	0,809	0,834	0,853	0,786	-0,347	0,927	-0,813	-0,922	0,577	1				
PSEUDO	-0,493	-0,006	0,206	-0,007	-0,106	0,360	0,148	-0,898	-0,108	-0,686	-0,233	0,249	0,178	1			
BAC	-0,208	-0,660	-0,159	-0,810	-0,896	-0,301	-0,273	-0,298	-0,760	0,175	0,591	-0,393	-0,625	0,412	1		
ACTINO	-0,491	0,239	0,383	0,108	0,008	0,634	0,460	-0,812	0,066	-0,816	-0,454	0,430	0,385	0,881	0,404	1	
IDM94	0,379	0,383	0,720	-0,101	0,062	0,103	-0,055	-0,208	0,531	-0,031	0,059	-0,521	0,291	-0,038	-0,271	-0,162	1

Se utilizaron los valores promedio para cada variable (N=6). Se marcan en gris las correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ).

Variables: pH; COrg.: carbono orgánico; N: nitrógeno total; contenido de bases: Ca, Mg, K y Na; RESIDUO: peso seco del rastrojo; humedad del suelo; DENSAPA: densidad aparente; textura: cantidad de arena, limo y arcilla; abundancia de *Pseudomonas fluorescens* (PSEUDO), *Bacillus* spp. (BAC) y actinobacterias (ACTINO); índice de impacto en la diversidad microbiana del dominio *Eubacteria* (IDM94: con referencia a la exclusión de pastoreo desde 1994).

Cuando se consideraron los datos de las dos estaciones combinadas, las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes y actinobacterias mostraron una correlación significativa positiva. Se observaron varias correlaciones significativas entre variables microbiológicas y fisicoquímicas. La abundancia de las poblaciones de bacterias se correlacionó negativamente con las siguientes variables:  $Mg^{2+}$  los *Bacillus* spp., residuo las actinobacterias y *Pseudomonas* fluorescentes, y densidad aparente las actinobacterias (tabla 6).

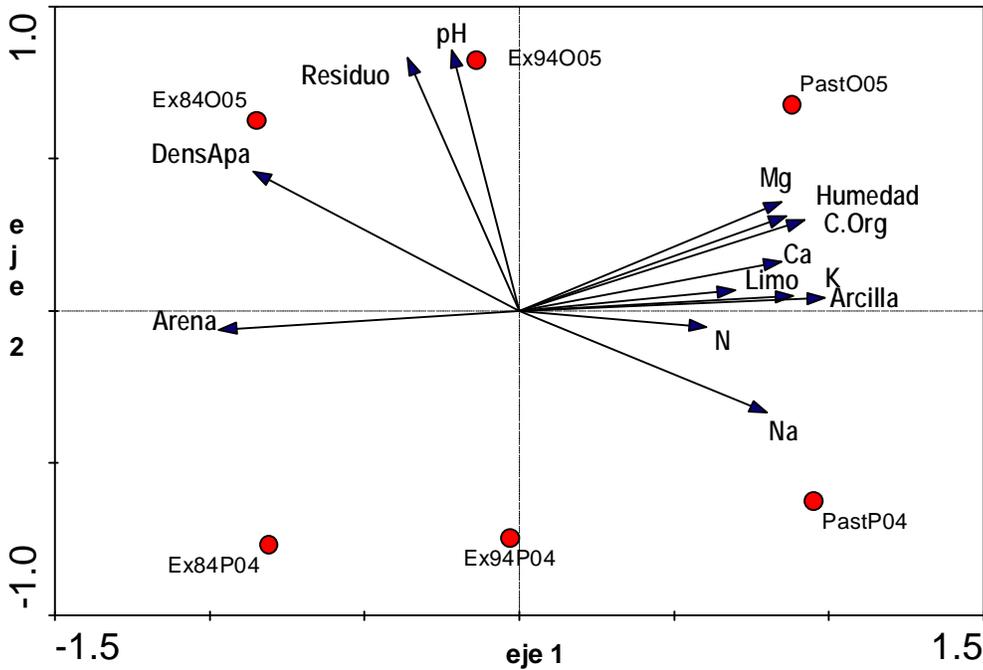
Considerando los nutrientes, se observaron correlaciones positivas entre COrg y K, entre Mg y Ca, y entre Mg y COrg con la humedad. En general, estas variables se correlacionan positivamente con el contenido de arcilla, y negativamente con el contenido de arena (tabla 6).

### 3.2. Análisis de Componentes Principales

Se analizaron las relaciones entre las variables fisicoquímicas y las muestras obtenidas en 2 estaciones (figura 18). El primer eje ordenó los tratamientos según el tiempo de exclusión, mientras que el segundo eje separó las estaciones de muestreo. Las variables que aportaron más al eje 1 fueron acilla, arena y C orgánico, seguidos por humedad, densidad aparente y los iones ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ ). Las muestras de suelo con pastoreo presentaron valores mayores para las variables que reflejan el contenido en nutrientes, cationes y humedad. El aporte al eje 2 fue principalmente de las variables pH y residuos en el rastrojo, con mayores valores en otoño.

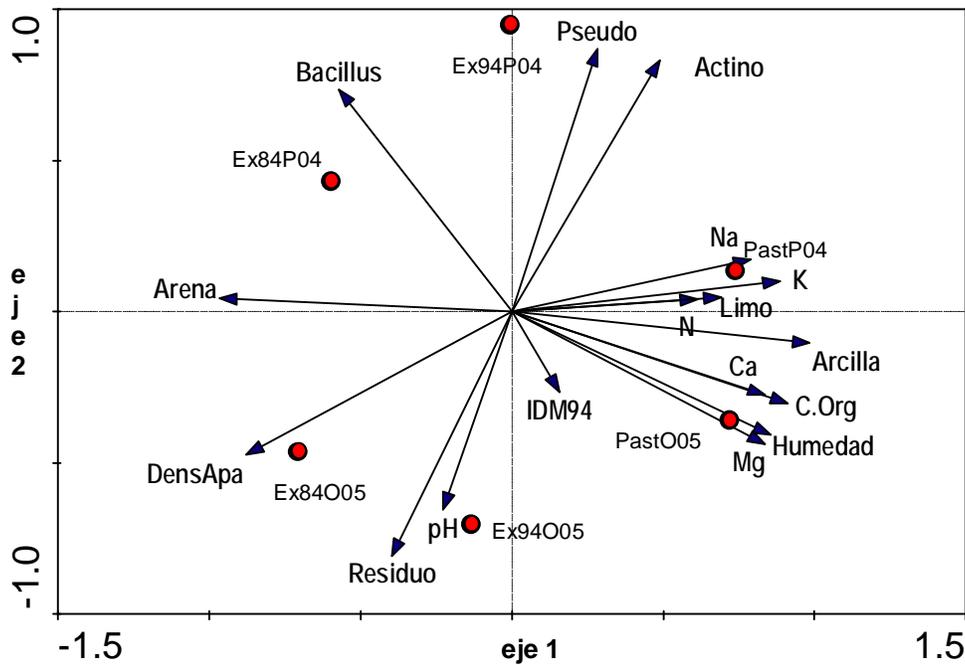
Para relacionar las variables fisicoquímicas con las microbiológicas determinadas en este estudio se realizó un análisis indirecto. Se correlacionaron los scores de las muestras en los 2 primeros ejes del PCA de la figura 18, con los valores medios de las variables microbianas. Las correlaciones no fueron estadísticamente significativas.

Se realizó un análisis de componentes principales incluyendo las variables microbiológicas, y la ordenación de las muestras resultó similar (figura 19). Otra vez el primer eje ordenó los tratamientos según el tiempo de exclusión, y el segundo eje separó las estaciones de muestreo. Las variables de abundancia de bacterias se ubicaron en los cuadrantes donde no había variables fisicoquímicas, aportando principalmente al eje 2 y con valores mayores hacia las muestras de primavera. El IDM94 se ubicó opuesto a la abundancia de *Bacillus* spp., y las poblaciones de *Pseudomonas* y actinobacterias aumentaron en sentido opuesto al pH y la cantidad de residuo vegetal.



**Variables:** pH; C.Org.: carbono orgánico; N: nitrógeno total; contenido de bases: Ca, Mg, K y Na; Residuo: peso seco del rastrojo; humedad del suelo; DensApa: densidad aparente; textura: cantidad de arena, limo y arcilla.  
**Muestras:** Ex84: exclusión de pastoreo desde 1984; Ex94: exclusión de pastoreo desde 1994; Past: pradera natural sometida a pastoreo bovino; P04: primavera de 2004; O05: otoño de 2005.

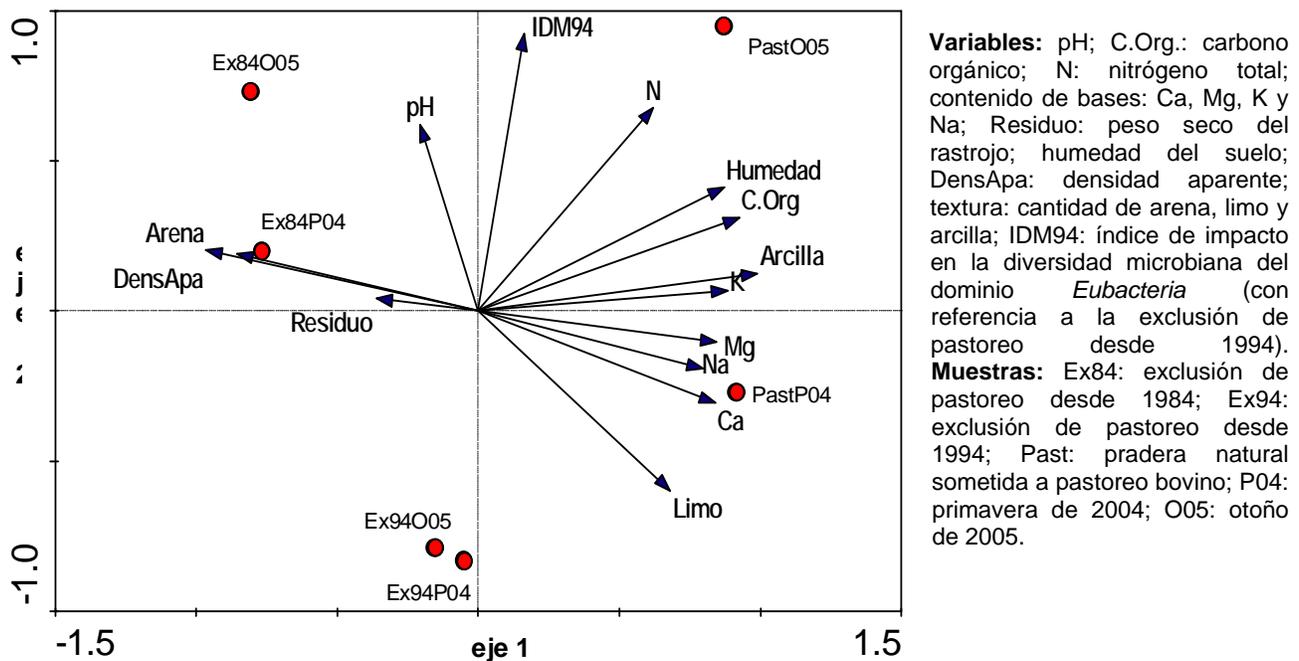
**Figura 18.** Análisis de componentes principales para las variables fisicoquímicas en las muestras de primavera de 2004 y otoño de 2005. Los porcentajes de la variación total explicado por los 2 primeros ejes fueron 62% y 16%.



**Variables:** pH; C.Org.: carbono orgánico; N: nitrógeno total; contenido de bases: Ca, Mg, K y Na; Residuo: peso seco del rastrojo; humedad del suelo; DensApa: densidad aparente; textura: cantidad de arena, limo y arcilla; abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes (Pseudo), *Bacillus* spp. y actinobacterias (Actino); IDM94: índice de impacto en la diversidad microbiana del dominio *Eubacteria* (con referencia a la exclusión de pastoreo desde 1994).  
**Muestras:** Ex84: exclusión de pastoreo desde 1984; Ex94: exclusión de pastoreo desde 1994; Past: pradera natural sometida a pastoreo bovino; P04: primavera de 2004; O05: otoño de 2005.

**Figura 19.** Análisis de componentes principales para las variables microbiológicas, físicas y químicas en las muestras de primavera de 2004 y otoño de 2005. Los porcentajes de la variación total explicado por los 2 primeros ejes fueron 52% y 23%.

Se realizó un análisis de componentes principales con las variables fisicoquímicas y el índice de impacto en la diversidad micobiana (IDM94), que resultó en un orden diferente de las muestras (figura 20). El eje 1 separó las muestras con pastoreo de las exclusiones, ordenándolas según el tiempo de exclusión. El eje 2 separó las muestras de otoños y primavera sólo en el caso del tratamiento con pastoreo, mientras que las muestras de las 2 estaciones de cada exclusión se ubicaron más próximas entre sí. El IDM94 aportó principalmente al eje 2 y se ubicó opuesto a las muestras de la exclusión desde 1994.



**Figura 20.** Análisis de componentes principales para las variables físicoquímicas y el IDM94 en las muestras de primavera de 2004 y otoño de 2005. Los porcentajes de la variación total explicado por los 2 primeros ejes fueron 58% y 18%.

# DISCUSIÓN

---

## 1. Abundancia de bacterias cultivables en suelo

En nuestro país existe escasa información acerca de las comunidades microbianas presentes en los suelos de pradera. En este trabajo se cuantificaron, además de bacterias heterótrofas aerobias, tres importantes grupos de bacterias del suelo: *Pseudomonas* fluorescentes, formadoras de esporas (principalmente *Bacillus* spp.) y actinobacterias.

El número de bacterias heterótrofas en el suelo de pradera estudiado en esta tesis fue en promedio  $2,5 \times 10^7$  ufc/g suelo. En suelos de praderas de Reino Unido, Nunan *et al.* (2006) y Clegg (2006) reportaron niveles similares de bacterias cultivables, mientras que en los estudios de Bardgett y Leemans (1995) realizados en otras praderas de Reino Unido el número de bacterias cultivables fue de un orden superior ( $1 \times 10^8$  ufc/g suelo). También en suelo de pradera de la misma región, pero en experimentos de microcosmos, se obtuvieron números de bacterias cultivables intermedios entre los trabajos anteriores (Mawdsley y Bardgett, 1997). Por otra parte, en 5 suelos de diversos orígenes de los EEUU, las poblaciones bacterianas resultaron de  $8,6 \times 10^6$  a  $3,2 \times 10^8$  ufc/g suelo (Gould *et al.*, 1985). En todos los trabajos anteriores las poblaciones de bacterias cultivables se determinaron por recuento en placas con medio TSA 1/10. En suelos de pradera de Holanda se enumeraron bacterias totales en medio R2A, obteniéndose valores de  $5 \times 10^7$  (van Elsas *et al.*, 2002). Thirup *et al.* (2003) contaron poblaciones de bacterias totales del orden de  $1 \times 10^8$  ufc/g en un suelo agrícola de Dinamarca, en placas de medio Winogradsky, pero obtuvieron un orden más ( $1 \times 10^9$  células/g de suelo) mediante recuento por microscopio.

En cuanto a las *Pseudomonas* fluorescentes, en esta tesis se determinaron poblaciones de alrededor de  $5 \times 10^5$  ufc/g suelo, por recuento en medio King's B (KB). Por la misma metodología, Mawdsley y Bardgett (1997), determinaron poblaciones de 2 a 3 veces superiores en suelo de pradera en experimentos de microcosmos. En praderas de Holanda se contaron poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes similares ( $3,5 \times 10^5$ ; van Elsas *et al.*, 2002), mientras que en suelos de diversos orígenes, se detectaron entre  $10^3$  a  $10^6$  ufc/g de suelo (Gould *et al.*, 1985; Johnsen y Nielsen, 1999; Thirup *et al.* 2001), indicando que existe bastante variabilidad en la abundancia de este grupo. Por otra parte, mientras que en el estudio de Thirup *et al.* (2001) los resultados fueron de  $10^5$  ufc/g suelo por la técnica de recuento, por PCR cuantitativo se detectaron  $10^7$  copias de ADN/g.

El número de bacterias formadoras de esporas, determinado por recuento en placa luego de un tratamiento térmico de la muestra, parece ser bastante comparable en varios suelos. En este trabajo se detectaron cantidades de  $2 \times 10^6$  ufc/g suelo de pradera, en suelos de pradera de Holanda  $7 \times 10^5$  (van Elsas *et al.*, 2002), mientras que en suelos de otros orígenes se han reportado números de  $1,8 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  ufc/g suelo (Travers *et al.*, 1987; Thirup *et al.*, 2003).

Por último, los valores de los recuentos de actinobacterias obtenidos en el presente trabajo fueron de  $4 \times 10^6$  a  $6 \times 10^7$  cfu/g suelo. En un estudio realizado en China con suelos de distintas regiones climáticas y con diferente vegetación, se determinaron abundancias de  $3 \times 10^5$  a  $1,4 \times 10^7$  cfu/g suelo (Xu *et al.*, 1996). En suelos de pradera de Holanda se contaron poblaciones de actinobacterias de  $1 \times 10^6$  (van Elsas *et al.*, 2002). Thirup *et al.* (2001) determinaron por recuento la cantidad de actinobacterias como  $4 \times 10^6$  ufc/g suelo, mientras en el mismo suelo por PCR estimaron  $2 \times 10^9$  copias de ADN/g.

La composición de especies de bacterias cultivables en suelos de una pradera de Escocia se investigó por análisis del ADNr 16S, tanto de aislamientos como de clones conteniendo ADN proveniente del suelo. Se aislaron cepas bacterianas en un medio selectivo para *Pseudomonas* y en el medio general TSA, que permite el crecimiento de un amplio rango de bacterias del suelo. En general, los aislamientos de TSA mostraron alta similitud con especies cultivadas presentes en las bases de datos de secuencias, pero no las secuencias provenientes del suelo. Por otra parte, existió muy poca superposición entre las comunidades de bacterias cultivadas y los clones (salvo por 1 aislamiento obtenido en cada medio) (Mc Caig *et al.*, 2001).

Estudios como este resaltan la importancia de analizar las comunidades microbianas con enfoques que contemplen tanto los microorganismos cultivables como el ADN total presente en el suelo.

## **2. Diversidad molecular de comunidades bacterianas en suelo**

En esta tesis se analizó la diversidad bacteriana en suelos de pradera amplificando por PCR regiones del ADNr 16S y separando los fragmentos obtenidos por DGGE. Utilizando cebadores generales para el dominio Eubacteria se observaron cambios en la estructura de la comunidad relacionados al pastoreo, especialmente al analizar las muestras obtenidas en otoño. Los patrones de bandeo resultaron a simple vista muy similares, pero al realizar un análisis de agrupamiento de las muestras y el cálculo de IDM, se evidenció el impacto del pastoreo sobre la estructura de la comunidad bacteriana.

En un trabajo que compara la estructura de la comunidad bacteriana en suelos sometidos a diferentes manejos agrícolas, se obtuvieron también *fingerprintings* complejos analizando por

DGGE los genes del ARNr 16S y de la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*). Por inspección visual, sólo se observaron pequeñas diferencias entre las muestras, siendo más claras para *rpoB* que para el ADNr 16S. Sin embargo, el análisis de agrupamiento de los patrones de DGGE generó dendogramas similares con ambos genes discriminando entre los sistemas de manejo, e incluso el dendograma derivado del ADNr 16S reveló un efecto de la profundidad del suelo sobre la estructura de la comunidad bacteriana (Peixoto *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Piao *et al.* (2008), los patrones de DGGE de la región V3 del ADNr 16S fueron en general similares para todos los tratamientos analizados. Las diferencias más notorias que obtuvieron fueron en la intensidad de las bandas más que en su posición. En esta tesis también se apreciaron diferencias en la intensidad de las bandas de DGGE entre muestras, pero no fueron incluidas en el análisis; solamente se consideró presencia o ausencia de las mismas.

También se analizaron en este trabajo grupos más específicos de bacterias, suponiendo que así podrían detectarse cambios en la estructura de la comunidad que no fueran evidentes en un análisis más general. Sin embargo, cuando se analizó la diversidad del género *Pseudomonas* los patrones de bandas resultaron tan variables que las diferencias entre réplicas fueron comparables a las diferencias entre los tratamientos.

El impacto a largo plazo de diferentes regimenes de manejo en praderas inglesas, sobre la estructura de la comunidad microbiana, fue evaluado por análisis multivariado de patrones de PCR-DGGE de determinados grupos bacterianos. La fertilización nitrogenada tuvo impacto significativo sobre la comunidad de *Eubacteria* y el drenado del suelo sobre las *Pseudomonas*, mientras que ambas prácticas impactaron la estructura de la comunidad de actinobacterias (Clegg *et al.*, 2003).

En este trabajo se intentó analizar también la diversidad de *Bacillus* spp. y actinobacterias mediante PCR-DGGE del ADNr 16S. Sin embargo, la calidad de los productos de PCR no fue suficiente para obtener patrones de bandas claros en los geles de DGGE. Esto podría superarse intentando ajustar más las condiciones de amplificación, para disminuir la aparición de ruido, si esta fuera la causa del problema. Otra posible explicación de lo ocurrido es el uso de cebadores de mala calidad, principalmente el que contiene la grampa GC, el cual es recomendable purificar por HPLC/<sup>1</sup>PAGE luego de su síntesis. La obtención de un cebador largo y con alto contenido en G+C solamente por precipitación salina puede llevar a la co-purificación de cebadores truncos que den lugar a amplicones inespecíficos y de tamaños variados.

---

<sup>1</sup> HPLC: cromatografía líquida de alta presión; PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

En este estudio, la variación entre las réplicas analizadas por DGGE fue a veces comparable a la variación entre los tratamientos, dificultando la observación de efectos sobre la estructura de la comunidad bacteriana causados por el pastoreo. Se observó una mayor reproducibilidad entre las réplicas del análisis de la comunidad de *Eubacteria* en las muestras de otoño, y en las obtenidas de la exclusión de 1994. Las razones se desconocen y probablemente sean complejas y atribuibles a diversos factores. Para superar esta dificultad de la variabilidad entre réplicas y obtener patrones característicos de los tratamientos, en algunos trabajos se realizan muestras compuestas con las repeticiones antes de correr el gel o se combinan los patrones de bandas de las réplicas en el análisis, conformando un dendograma integrado más robusto (Sutanto, 2005; Aboim *et al.*, 2008).

En el estudio de praderas con o sin pastoreo de Clegg (2006) se observó también gran variación entre las réplicas de los patrones de bandeo de PCR-DGGE y en el análisis de PLFA. La variación espacial es inherente a los estudios de campo y ha sido reportada previamente en estudios fenotípicos de comunidades microbianas (perfiles metabólicos, FAME y medidas de procesos). También existe cierta evidencia de la variación en la composición espacial de las comunidades microbianas basada en estudios moleculares a diferentes escalas. En algunos casos la variación en el ADN de la comunidad microbiana entre réplicas puede ser tan grande como la variación entre tratamientos, encubriendo ciertos efectos del tratamiento. Se ha reportado que la heterogeneidad espacial en suelos de praderas puede ocurrir en escala de centímetros (Ritz *et al.*, 2004; Clegg, 2006). Por estas razones, el estudio del ADN de la comunidad extraído del suelo, resulta generalmente en patrones de *fingerprintings* complejos, difíciles de resolver e interpretar. Algunos investigadores han optado por reducir esta complejidad analizando por DGGE bacterias aisladas por cultivo, asumiendo que la selectividad de los medios de cultivo y de las condiciones de incubación inherente a este método limita el número y diversidad de los microorganismos recuperados a partir de muestras naturales. Usando este enfoque, Sutanto (2005) obtuvo un mayor número de OTUs (*operational taxonomic units*) y una riqueza similar dentro de los tratamientos estudiados en comparación que con la metodología independiente de cultivo.

Es importante tener en cuenta que las técnicas basadas en el análisis de los genes de ARNr amplificados por PCR pueden no representar una imagen completa o precisa de la comunidad bacteriana. Primero, la diversidad de especies es tan grande que las secuencias recuperadas representan una muestra incompleta. La estimación de la diversidad genética por la técnica de DGGE está limitada a los miembros dominantes de las comunidades microbianas, los cuales deben representar al menos 1% de la población microbiana total para dar una banda visible en un gel de DGGE (Muyzer *et al.*, 1993). Además, pueden existir sesgos en la contribución de los diferentes grupos: la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos puede ser diferente para

diferentes bacterias, el número de copias génicas del ARNr puede variar, y puede haber amplificación preferencial de algunos tipos de secuencia respecto a otros. Siendo concientes de estas limitaciones, estas técnicas permiten un estudio inicial de la estructura global de la comunidad bacteriana del suelo (Janssen, 2006).

La presencia o ausencia de determinada OTU no significa nada acerca de la actividad real *in situ* de la población microbiana, por lo que una medida de diversidad no es suficiente para proporcionar un panorama de las consecuencias de cambios en la estructura de la comunidad microbiana sobre la calidad y función del suelo (Sutanto, 2005). Sin, embargo, conocer el grado de impacto que sufren las comunidades microbianas bajo diferentes sistemas de manejo puede ayudar a desarrollar y monitorear prácticas con impacto reducido, asumiendo que un menor impacto implica una mayor probabilidad de que las funciones ecosistémicas que dependen de la actividad microbiana del suelo se conservan en niveles similares a los de ecosistemas no perturbados (Aboim *et al.*, 2008).

### **3. Relaciones entre variables biológicas y fisicoquímicas del suelo**

Los datos de PCR-DGGE del ADNr 16S de *Eubacteria* fueron incorporados a los análisis multivariados a través de los valores de impacto sobre la diversidad microbiana (IDM) provocado por el pastoreo. Para su cálculo se utilizaron como referencia praderas excluidas del ganado por aproximadamente 20 (IDM84) o 10 años (IDM94). Ambos índices reflejaron un cambio en la estructura de la comunidad de pradera debido al pastoreo, principalmente en las muestras de otoño.

El IDM fue desarrollado por Aboim *et al.* (2008) para comparar la estructura de la comunidad microbiana en suelos con cultivos, barbecho o selva nativa en regeneración por 15, 30 o 70 años. Estos dos últimos usos del suelo fueron utilizados como referencia para calcular los valores de IDM (IDM30 o IDM70) a partir de los datos de PCR-DGGE del gen *rpoB*. Se observó una disminución gradual del IDM70 al aumentar el tiempo de recuperación de la selva, pero no se lograron diferenciar los suelos en descanso (con barbecho) de los cultivos. Sin embargo, el IDM30 sí discriminó entre el suelo con descanso más prolongado y los otros usos del suelo.

En el estudio de correlaciones y los análisis multivariados se observaron ciertas relaciones entre las variables analizadas. Las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes y de actinobacterias se correlacionaron positivamente, y a su vez el número de actinobacterias mostró una correlación negativa con la densidad aparente. Un mayor valor en este parámetro es desfavorable para el desarrollo de raíces, siendo lógico que lo sea también para la abundancia de bacterias comúnmente asociadas a la rizósfera. Las dos poblaciones

mencionadas también mostraron una correlación negativa con la cantidad de rastrojo. El residuo vegetal fue lógicamente más abundante en otoño y las bacterias se vieron favorecidas en primavera.

En un proyecto donde se caracterizaron sistemas de producción (tanto en Glencoe como en otros 2 ensayos) mediante el estudio de la comunidad microbiana, el potencial patogénico del suelo y la macrofauna, los muestreos de otoño generaron variables más discriminantes y robustas en los análisis multivariados (Informe final del proyecto PDT 29/108). En la literatura se ha sugerido que los cambios permanentes en la actividad biológica del suelo conviene estudiarlos en primavera, y los efectos específicos de las plantas analizando muestras tomadas en otoño (Öhlinger, 1996; Kuske *et al.*, 2002).

En los análisis de componentes principales (ACP) realizados en esta tesis, las muestras se ordenaron a lo largo del eje principal según el tiempo de exclusión de pastoreo. Las variables principalmente responsables por la discriminación observada fueron las relacionadas a textura, humedad y contenido en nutrientes. El análisis del segundo eje mostró una separación de las muestras según la estación de muestreo, resultando las variables microbiológicas asociadas a mayormente este eje. Algo similar se observó en análisis de Co-Inercia combinando variables fisicoquímicas y de la macrofauna del suelo medidas en el ensayo de Glencoe: el primer factor de ordenación respondió a la vegetación y al manejo y el segundo al momento de muestreo (Zerbino, 2005).

Bardgett *et al.* (1997), realizaron un análisis de DCA (*Detrended Correspondence Analysis*) para relacionar las comunidades microbianas estudiadas por PLFA de diferentes suelos. Las mayores diferencias a lo largo de los ejes 1 y 2 (que fueron responsables del 42 y 11% de la varianza, respectivamente) fueron entre comunidades microbianas de suelos de distinto tipo y luego de distinto origen geográfico. Las diferencias que se evidenciaron entre las comunidades microbianas de las praderas pastoreadas o no por ovinos fueron en el segundo eje, y sólo para un tipo de suelo, en las 2 regiones estudiadas. Los scores del eje 1 estuvieron fuertemente correlacionados con el pH del suelo y el % de pérdida por ignición (LOI%).

En la presente tesis no se obtuvieron correlaciones significativas entre los scores del ACP realizado con las variables fisicoquímicas y las variables microbiológicas.

A partir de los resultados del ACP se puede seleccionar un conjunto mínimo de variables que podrían servir como indicadores de calidad de suelo y ser usados para monitorear las perturbaciones que se llevan a cabo en el área de estudio. Aboim *et al.* (2008) sugirieron ciertos indicadores que podrían ser suficientes para monitorear la calidad del suelo: el

contenido en Ca y la saturación de bases como indicadores de fertilidad, el IDM30 (impacto en la diversidad microbiana respecto a una selva recuperada por 30 años) y el contenido en C orgánico como indicadores biológicos de salud del suelo, y el índice de estabilidad de los agregados como un indicador de la estructura del suelo. Bajo diferentes condiciones ambientales, incluyendo tipo de suelo, clima, topografía e hidrología, así como uso del suelo, las variables más efectivas en discriminar los diferentes tratamientos analizados podrían ser distintas. Estos autores proponen que se realice un análisis exploratorio de este tipo, previo a la realización de un proyecto de monitoreo extensivo.

#### **4. Pastoreo en praderas: efecto sobre el suelo y la comunidad vegetal**

Los efectos del pastoreo por ganado y otros herbívoros sobre la función del ecosistema, particularmente sobre la productividad vegetal, han sido sujeto de muchos estudios.

Se cree que el pastoreo por ganado perjudica menos la calidad del suelo que el manejo convencional de cultivos; sin embargo, la calidad del suelo puede ser perjudicada por la compactación y la remoción continua de la cobertura vegetal. El pastoreo por ganado también puede afectar la biomasa y diversidad vegetal, produciendo parches que difieren en tamaño y especies de plantas. La composición de especies puede cambiar de pastos perennes a anuales. Estos sistemas se vuelven más susceptibles a la invasión por malezas de hoja ancha que degradan la productividad del suelo, debido a que producen menos biomasa aérea y dejan la superficie del suelo vulnerable a la erosión. Además, el sobrepastoreo y la recolonización por malezas han llevado a disminuciones de la cantidad de agua disponible (por reducción de la tasa de infiltración) y del aporte de materia orgánica al suelo, respecto a la presencia de pastos que poseen sistemas radiculares fibrosos (Kennedy *et al.*, 2004).

Un tema controversial es si las plantas compensan (o incluso sobre-compensan) la pérdida moderada de tejido por herbivoría aumentando la productividad, o si la herbivoría disminuye la productividad (Kieft, 1994).

En experimentos en macetas utilizando suelos de Amboseli (región al sur de Kenia) y una especie de pasto que es naturalmente pastoreada por herbívoros (*Sporobolus kentrophyllus*), se determinó que la producción aérea de la planta puede ser estimulada por el pastoreo. Sin embargo, las respuestas de las plantas a la defoliación pueden variar ampliamente, dependiendo de complejas interacciones entre otros factores tales como la frecuencia e intensidad del corte de las hojas y la disponibilidad de nitrógeno y agua en el suelo (Georgiadis *et al.*, 1989).

En experimentos con la gramínea *Kyllinga nervosa* de la región del Serengeti (Tanzania) se evaluaron los efectos de la altura y frecuencia de corte, la concentración de nitrógeno y la

frecuencia de riego sobre diferentes componentes del rendimiento, los cuales resultaron afectados por diferentes factores ambientales. La biomasa que se retira por corte (rendimiento para los herbívoros) fue controlada por el aporte de nitrógeno, la biomasa residual (rendimiento para los productores) por el agua, y la biomasa muerta (rendimiento para los descomponedores) por la altura del corte y el nitrógeno. El crecimiento de las plantas fue estimulado por la defoliación, aunque con diferentes resultados: existió una sobre-compensación de la cantidad removida por defoliación moderada y con alta cantidad de nitrógeno, una sub-compensación bajo defoliación severa, y una compensación equivalente bajo otras condiciones (Mc Naughton *et al.*, 1983).

El pastoreo por grandes herbívoros con frecuencia aumenta la riqueza de especies vegetales en praderas con productividad de moderada a alta. En praderas de Norteamérica pastoreadas por visones se evaluaron los mecanismos que pudieran explicar un 25% de aumento en la riqueza en zonas con pastoreo durante 8 años. Las variables fuertemente relacionadas a este fenómeno fueron la heterogeneidad espacial de la luz y la tasa de rotación de especies, y no la disponibilidad de agua ni de nitrógeno. Esto sugirió que la creación de un mosaico de parches con alta y baja biomasa (determinante primario de la disponibilidad de luz) y la promoción de especies dinámicas, son los mecanismos más importantes por los cuales los herbívoros afectan la riqueza de especies en este tipo de praderas (Bakker *et al.*, 2003).

En Uruguay existen estudios del impacto del pastoreo sobre la composición de especies vegetales, la estructura de la comunidad de pradera y su productividad.

En praderas naturales del departamento de Cerro Largo la diversidad vegetal disminuyó luego de la exclusión del pastoreo por herbívoros domésticos durante 9 años. También se observó una sucesión en la composición de especies que resultó en cambios en los atributos de gramíneas y hierbas (Rodríguez *et al.*, 2003).

En otra pradera del departamento de San José, los tratamientos estudiados fueron: i) área continuamente pastoreada, ii) exclusión de herbívoros domésticos por 9 años y iii) simulación de pastoreo dentro de la exclusión para obtener una biomasa parecida al área pastoreada. En el área con pastoreo se observó un reemplazo de pastos erectos de estación fría por pastos rastreros de estación templada. La productividad primaria neta aérea (ANPP: *above-ground net primary production*) resultó ser 51% mayor con pastoreo que en la exclusión, y las parcelas con pastoreo simulado fueron 29% más productivas que con pastoreo. Los autores postularon que el efecto del pastoreo tendría dos componentes: 1) el componente estructural que resultó en mayor ANPP, probablemente debido a la eliminación de biomasa muerta en pie; 2) el componente de la composición de especies que resultó en menor ANPP una vez controlado el componente estructural, debido probablemente al cambio hacia la fenología de estación

templada. Estos resultados contrastan con un experimento similar en la Pampa argentina, lo que sugiere que la relación entre pastoreo y estructura y función de la comunidad es difícil de generalizar (Altesor *et al.*, 2005).

La controversia acerca de los efectos del pastoreo sobre la productividad se extiende a los procesos del suelo, ya que si existe un crecimiento aéreo compensatorio podría ser a costo de una disminución de la transferencia de fotosintatos a las raíces, lo que se ha observado como disminución de la biomasa radicular debida al pastoreo. Como los microorganismos del suelo están generalmente limitados en su disponibilidad de C orgánico, es probable que estén directamente influenciados por la productividad vegetal (a través de la deposición de rastrojo, los exudados radiculares y la muerte de las raíces), y por lo tanto indirectamente influenciados por la herbivoría. Los animales también pueden afectar directamente las condiciones del suelo mezclando y compactando el suelo y redistribuyendo nutrientes, lo que a su vez puede afectar a los microorganismos del suelo (Kieft, 1994).

El funcionamiento del sistema bajo el suelo depende en gran parte de la calidad y cantidad de ingreso de carbono originado en la fotosíntesis, y está por lo tanto influenciado por la composición y diversidad de la comunidad vegetal. El pastoreo por herbívoros tiene un impacto cualitativo y cuantitativo sobre la vegetación, y por lo tanto también en el funcionamiento del sistema bajo el suelo. Los herbívoros prefieren las especies vegetales más palatables, dejando aquellas con altas concentraciones fenólicas. Esto reduce el ciclado de materia orgánica del suelo y hace que los residuos sean más recalcitrantes, con poco N y P disponible y altas concentraciones de fenoles (que actúan como mecanismos de defensa contra descomponedores y herbívoros). Alternativamente, los herbívoros pueden acelerar el ciclado de nutrientes aportando orina y heces con sustancias ricas en N fácilmente degradables (Ohtonen y Väre, 1998).

Se requiere un manejo adecuado de las praderas para proteger el suelo de efectos negativos del pastoreo y mantener los beneficios de la cobertura vegetal permanente (Kennedy *et al.*, 2004).

## **5. Pastoreo en praderas: efectos sobre la comunidad microbiana**

En distintas regiones del planeta se han realizado algunos estudios para determinar el efecto del pastoreo por herbívoros sobre la microbiota edáfica en ecosistemas de pradera. Estos trabajos comparan la situación de una pradera pastoreada por herbívoros y de la misma en predios donde no se permite el ingreso de los animales. Además de las diferencias entre estos

estudios debidos a las características del suelo, clima y especies vegetales que componen la pradera, en los diversos trabajos varían los animales cuyo efecto por herbivoría se quiere estudiar, el tiempo de exclusión, la intensidad de pastoreo (en tiempo o densidad de animales), las variables estudiadas y las técnicas para su determinación. Debido a esto y a que en general los estudios son puntuales (en un lugar en concreto y en un momento de muestreo) es difícil comparar sus resultados y más aún sacar conclusiones generales. A continuación se discuten los principales resultados de algunos de estos estudios y, cuando es posible, se comparan con los obtenidos en esta tesis.

La respuesta de algunos grupos o procesos microbianos ha sido más extensamente estudiada, tales como las micorrizas o el ciclo del nitrógeno, que se comentarán por separado. También se han analizado de forma aislada algunos fenómenos relacionados al pastoreo que pueden ser responsables de modificaciones en la microbiota, tales como la defoliación y el aporte de orina y heces por parte de los herbívoros.

Los resultados de varios estudios sugieren que la herbivoría por grandes animales es uno de los determinantes más importantes de los procesos microbianos del suelo en los ecosistemas de pradera (Bardgett *et al.*, 1997).

En una pradera experimental de Inglaterra se desarrolló un estudio para determinar si el pastoreo por ganado tiene un impacto sobre la composición de la comunidad microbiana del suelo. El recuento de hongos fue mayor en las parcelas con pastoreo respecto a la exclusión por 15 años, mientras que no se obtuvieron diferencias en el recuento de bacterias totales. Los perfiles de PCR-DGGE indicaron que el pastoreo tuvo un impacto sólo sobre la estructura de la comunidad de *Pseudomonas*, mientras que el agregado de N inorgánico como fertilizante impactó sobre las 3 comunidades estudiadas (*Eubacteria*, *Actinobacteria* y *Pseudomonas*). Se encontró una correlación significativa entre el pH del suelo y los perfiles de la comunidad de *Pseudomonas*. No se observaron diferencias en los perfiles de la comunidad de hongos entre los tratamientos. También se analizó la comunidad por PLFA, y se observó que la abundancia de los ácidos grasos característicos de bacterias, actinobacterias y hongos no fueron afectados directamente por el pastoreo ni la fertilización con N, pero sí por la interacción de ambos tratamientos. Algunos PFLA indicativos de bacterias Gram(+) y Gram(-) fueron más abundantes en el tratamiento con pastoreo (Clegg, 2006).

Los resultados de esta tesis mostraron un efecto del pastoreo sobre la estructura de la comunidad de *Eubacteria*, analizada por PCR-DGGE, mientras que el efecto sobre la comunidad de *Pseudomonas* spp. no fue tan evidente. En el ACP realizado con los datos de Glencoe la abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes mostró cierta relación con el pH.

En el estudio de Clegg (2006) el C total y el % de material orgánica fueron mayores en la parcela pastoreada, coincidente con lo observado en Glencoe, donde se registró un aumento de C orgánico relacionado al pastoreo. Sin embargo, en Glencoe se detectó un aumento del contenido de N total del suelo en la pradera pastoreada, que no fue observado en el trabajo de Clegg (2006).

En praderas semiáridas excluidas de pastoreo por ganado 0, 11 y 16 años, del refugio de vida salvaje Sevilleta (New Mexico, EE.UU.), se determinó que el pastoreo no tuvo un efecto consistente sobre el C orgánico, el C en la biomasa microbiana, ni sobre la respiración basal. Al aumentar el tiempo de exclusión, disminuyó la relación C microbiano:C orgánico y aumentó el cociente metabólico (respiración/C microbiano) (Kieft, 1994). En el experimento de Glencoe, en las 2 estaciones donde se determinó el C orgánico, se observó que el valor de esta variable fue mayor en la pradera con pastoreo aunque se desconoce la significancia estadística de este resultado, ya que el estudio de esta variable no era parte de los objetivos de esta tesis.

Estudios en ecosistemas de pradera del Parque Nacional Serengeti (Tanzania) demostraron que las tasas de procesos biológicos del suelo aumentan al aumentar la intensidad del pastoreo por grandes mamíferos migratorios (antílopes, cebras, gacelas). Parámetros tales como N total, C orgánico, pH, contenido en arcilla, biomasa microbiana y mineralización de N estuvieron directamente relacionados con la intensidad del pastoreo (Ruess y McNaughton, 1987; Seagle *et al.*, 1992). Excepto para el pH, las mismas tendencias fueron observadas en el ensayo de Glencoe: el N total, el C orgánico y el contenido de arcilla fueron mayores en el tratamiento con pastoreo, presentando los dos últimos valores menores en la exclusión de mayor tiempo.

En praderas del norte de Gales, la remoción por corto o largo plazo del pastoreo por ovinos (2 años o 37 años, respectivamente) resultó en reducciones significativas en la biomasa y actividad microbianas del suelo superficial (ésta última medida como respiración, actividades deshidrogenada, ureasa y fosfatasa) (Bardgett y Leemans, 1995; Bardgett *et al.*, 1997).

La remoción de corto plazo no tuvo efecto significativo sobre el número de bacterias u hongos cultivables (Bardgett y Leemans, 1995). En el presente estudio tampoco se observaron efectos de la exclusión de pastoreo por 10 o 20 años sobre la abundancia de bacterias heterótrofas.

La exclusión del pastoreo no tuvo un efecto significativo sobre la diversidad microbiana medida a través del análisis de ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFA) y expresada como el índice de Shannon-Weaver, pero sí afectó la estructura de la comunidad microbiana (Bardgett *et al.*, 1997). En el presente trabajo también se observó un efecto de la exclusión de pastoreo bovino

por 10 o 20 años sobre la estructura de la comunidad bacteriana estudiada por DGGE, evidenciado por el análisis de agrupamiento y los datos de IDM.

La abundancia de hongos activos (medida por el análisis de ácidos grasos) fue reducida significativamente por la remoción de pastoreo, al igual que la relación hongos/bacterias, mientras que los ácidos grasos bacterianos no se vieron afectados (Bardgett *et al.*, 1997). Este efecto también había sido observado anteriormente por determinación del micelio fúngico activo con diacetato de fluoresceína (Bardgett *et al.* 1993b) y en estudios de la relación entre la respiración inducida por sustrato de hongos y bacterias (Bardgett *et al.*, 1996), atribuyéndose a la ausencia de heces que podrían estimular la proliferación de hongos coprófilos. Los cambios en la estructura de la comunidad microbiana también pueden estar relacionados a cambios en la actividad de animales del suelo que se alimentan de microorganismos, tales como los colémbolos fungívoros (Bardgett *et al.*, 1993a, 1993b), a la remoción de sustrato rápidamente utilizable (orina y excremento de oveja) y a cambios en la cantidad y calidad de los exudados radiculares (Bardgett *et al.*, 1997; Mawdsley y Bardgett, 1997).

En regiones de submontaña en el Reino Unido, resultados de 3 localidades mostraron tendencias en las comunidades microbianas del suelo que acompañan transiciones sucesionales de plantas relacionadas a la historia y la intensidad del pastoreo. La biomasa microbiana fue máxima en niveles de pastoreo bajos a intermedios, y la equitatividad (componente de la diversidad) de la comunidad microbiana disminuyó al aumentar la intensidad de pastoreo. Estos autores observaron que las comunidades microbianas de sitios fuertemente pastoreados están dominados por canales energéticos de descomposición basados en bacterias (dominados por Gram positivas), mientras que en sistemas que son pastoreados menos intensivamente, o no pastoreados, los hongos tienen un rol mayor proporcionalmente (Bardgett *et al.*, 2001)

En esta tesis se detectó un aumento significativo del número de actinobacterias (bacterias Gram positivas) asociado al pastoreo, pero la comunidad de hongos no fue estudiada.

Estudios en otros agroecosistemas mostraron que la fauna del suelo de praderas con bajos insumos o manejo intensivo está dominada por animales que se alimentan de bacterias u hongos, respectivamente (Bardgett *et al.*, 2001). Estos cambios podrían estar también relacionados a la disponibilidad de N en el suelo. En varios estudios se vio que la relación de PLFA de hongos:bacterias estaba negativamente correlacionada con la concentración de N mineral en suelo (Bardgett *et al.*, 1999; Bardgett y Mc Alister, 1999, Bardgett *et al.*, 2001).

En una pradera de Chihuahuan Desert (New Mexico, EE.UU.) se midieron los efectos del sobrepastoreo por ganado (2-3 años) sobre la diversidad funcional y actividad microbianas del suelo. El pastoreo intensivo (40-90 cabezas de ganado/há por 24-48h en primavera o invierno)

no tuvo efectos significativos sobre la diversidad en la utilización de sustratos carbonados ni en la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina, sulfatasa y deshidrogenasa. Sí se observaron efectos sobre los parámetros medidos luego de otros tipos de estrés tales como sequía, desmalezado e incendio (Liu *et al.*, 2000).

Los autores de los trabajos en el Serengueti, postulan que la competencia por nitrógeno entre pastos y microorganismos sería mayor en situaciones con menor intensidad de pastoreo dado que contienen menor N total en el sistema (Seagle *et al.*, 1992). Cuando la intensidad de pastoreo es mayor, el crecimiento microbiano y las tasas de ciclado de N parecen estar más limitadas por C que por N. En estos estudios también los procesos microbianos del suelo se correlacionaron con la intensidad de la herbivoría, mostrando que los herbívoros impactan fuertemente los procesos de ciclado de nutrientes donde se alimentan. Al consumir la mayoría de la vegetación aérea, acortan los pasos potencialmente limitantes de la producción y descomposición de residuos, devolviendo rápidamente a la superficie del suelo nutrientes disponibles para las plantas en forma de heces y orina. Por lo tanto, este retorno de nutrientes combinado con la defoliación acelera las tasas de ciclado de nutrientes a través de los efectos directos sobre la toma de nitrógeno por plantas y microorganismos y las tasas de mineralización en el suelo (Ruess y Seagle, 1994).

### **5.1. Pastoreo en praderas: bacterias del ciclo del nitrógeno**

El ciclo del nitrógeno es muy importante en ecosistemas de pradera, por lo que ha sido ampliamente estudiado respecto a los efectos causados por el pastoreo.

Los herbívoros frecuentemente aumentan el ciclado de N, lo que puede aumentar la disponibilidad de N para las plantas (Mc Naughton *et al.*, 1997). El pastoreo puede afectar tanto los procesos microbianos involucrados en el ciclado del N del suelo como el tamaño y composición de los grupos funcionales claves en la dinámica del N. Los cambios en la actividad y la estructura genética de estos grupos funcionales de bacterias pueden explicarse por diversos efectos directos e indirectos incluyendo: (i) ingreso de N en orina y heces (ii) cambios en la porosidad del suelo por el pisoteo de los animales, (iii) cambios en la competencia por N entre microorganismos y plantas recién defoliadas, (iv) cambios en las tasas de ingreso y calidad de los residuos vegetales y en los exudados radiculares debido a la defoliación. Sin embargo, el régimen de pastoreo también puede modificar la composición de especies vegetales, las cuales pueden influir sobre la nitrificación, desnitrificación y fijación de N<sub>2</sub>. Además, las especies vegetales pueden influir en la estructura de las comunidades microbianas del suelo (Patra *et al.*, 2006).

Dentro de los grupos de microorganismos estudiados en este trabajo, existen representantes que intervienen en los diferentes pasos del ciclo del nitrógeno. Varias especies de *Pseudomonas* han sido descritas como diazótrofes, entre las que se encuentran: *P. stutzeri*, *P. diazotrophicus*, *P. saccharophila*, *P. paucimobilis*, *P. azotocolligans*, *P. azotifigens* (Hatayama *et al.*, 2005; Mirza *et al.*, 2006). Entre los *Bacillus* y especies relacionadas se encuentran las siguientes bacterias capaces de fijar N: *Bacillus azotofixans*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus gaminis* (Berge *et al.*, 2002, Elkoca *et al.*, 2008). También dentro de las actinobacterias existen fijadores de nitrógeno, siendo los más conocidos los del género *Frankia* y algunos *Streptomyces* (Valdés *et al.*, 2005; Elkoca *et al.*, 2008). También se han descrito cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Actinobacterias* con actividad nitrificante, desnitrificante y de mineralización de nitrógeno (Beare *et al.*, 1995; Wrage *et al.*, 2001; Tiquia *et al.*, 2005);

En diferentes ecosistemas de pradera se ha observado que el pastoreo por largo plazo (de años a décadas) estimula el ciclo del N.

En praderas del Parque Nacional de Yellowstone (EE.UU.), se determinó que la desnitrificación está regulada por los herbívoros. Se estudió la influencia del pastoreo por ungulados migratorios sobre la desnitrificación, examinando el efecto de la aplicación de orina artificial y comparando las tasas de este proceso dentro y fuera de exclusiones de largo plazo (33 a 37 años). La aplicación de orina artificial no influyó en la desnitrificación a nivel de la comunidad. Los herbívoros afectaron este proceso solamente en los sitios con mayor humedad. La actividad enzimática (medida del potencial de desnitrificación) se correlacionó positivamente con la humedad del suelo en los sitios excluidos. La desnitrificación aumentó con el agregado de glucosa pero no de nitrato, sugiriendo que este proceso está limitado por la cantidad de C lábil, variable estimulada por los ungulados (Frank y Groffman, 1998).

Para estudiar de cómo los ungulados influyen en la dinámica del nitrógeno, se examinó la tasa de 4 procesos: mineralización (M), nitrificación (N), desnitrificación (D) y lixiviación de N inorgánico (L). Los 3 primeros procesos estuvieron relacionados lineal y positivamente, y los herbívoros redujeron las relaciones N/M y D/M. No hubo relación entre M o N con L, y este proceso no se vio afectado por el pastoreo. Los resultados sugirieron que el pastoreo aumenta la disponibilidad de nitrógeno en las praderas (estimulando la mineralización neta y la nitrificación) y favorece su conservación (reduciendo las pérdidas del suelo). Los herbívoros promueven la retención de N estimulando la productividad microbiana, probablemente favoreciendo el C lábil en el suelo. Holland y Detling (1990) aportaron fuerte evidencia que en áreas pastoreadas por visones en el Parque Nacional Wind Cave (South Dakota, EE.UU.), el

bajo potencial de inmovilización de N y el aumento de la mineralización neta de N estaban ligados a menores aportes de carbono por las raíces. Estos datos evidencian el control por parte de los consumidores de la disponibilidad de N para las plantas, la productividad microbiana y la retención de N (Frank *et al.*, 2000).

Le Roux *et al.* (2003) evaluaron si cambios en la nitrificación y desnitrificación son debidos a cambios en la vegetación, comparando la actividad de las enzimas involucradas en praderas pastoreadas por ovejas durante 13 años. Ambas actividades fueron mayores en los sitios con pastoreo intensivo, y existió una mayor estimulación de la nitrificación respecto a la desnitrificación. Se observaron cambios marcados en la composición de especies vegetales, pero para un régimen de pastoreo dado la especie vegetal no afectó las actividades, por lo que la modificación de la composición de especies no es el principal factor que conduce a cambios en la nitrificación ni desnitrificación. Factores tales como pisoteo, N que regresa en los excrementos de los animales y/o modificación de la toma de N y de C exudado por las plantas desfoliadas podrían ser responsables del aumento en las actividades microbianas (Le Roux *et al.*, 2003).

Patra *et al.* (2005) determinaron que el pastoreo por ovinos aumenta la actividad de grupos funcionales microbianos involucrados en la dinámica del N e induce cambios en el tamaño y composición/estructura sus comunidades. Se detectó mayor actividad microbiana (nitrificación, desnitrificación, fijación de N<sub>2</sub> y mineralización de C) y mayor número de heterótrofos, nitrificantes y desnitrificantes (medido por NMP<sup>2</sup>) en los sitios con pastoreo intensivo que en los sitios con pastoreo suave. El cambio en el tamaño de la comunidad fue de mayor amplitud que en la actividad enzimática. En ambos tratamientos se encontró diferente composición/estructura de las comunidades, evaluada por varias técnicas: microbiana (por PLFA), bacteriana (por RISA<sup>3</sup>), nitrificante (PCR-DGGE) y fijadora de N<sub>2</sub> (PCR-RPLP<sup>4</sup>), pero no la desnitrificante (PCR-RFLP). De los grupos microbianos analizados por PLFA (hongos, bacterias, bacterias Gram (+) y Gram (-)), los actinomicetes fueron los únicos que aumentaron en respuesta al pastoreo.

En el presente trabajo también se observó un aumento significativo del número de actinobacterias en respuesta al pastoreo (medido por la técnica de recuento en placa) así como un cambio en la estructura de la comunidad bacteriana (evaluada por PCR-DGGE).

---

<sup>2</sup> NMP: número más probable

<sup>3</sup> RISA: análisis de la región ribosomal intergénica (del inglés: *ribosomal intergenic spacer analysis*)

<sup>4</sup> RFLP: polimorfismo del largo los fragmentos de restricción (del inglés: *restriction fragment length polymorphism*)

Para evaluar si los cambios en la comunidad bacteriana del suelo debidos al pastoreo son mediados por las perturbaciones inducidas por el manejo o indirectamente por cambios en la identidad de las principales especies de plantas, Patra *et al.* (2006) cuantificaron SIR, actividades del ciclo del N y caracterizaron las comunidades/estructura genética de *Eubacteria* y de grupos funcionales involucrados en la dinámica del N, bajo matas de pastos de las 3 especies vegetales dominantes en praderas con manejo extensivo o intensivo.

La respiración inducida por sustrato no fue afectada por el manejo ni las especies vegetales, mientras que la actividad desnitrificante fue afectada sólo por la especie vegetal; se observó interacción manejo-especie vegetal para las actividades de fijación y nitrificación. Los cambios en la nitrificación estuvieron explicados por los cambios en la concentración de amonio, pero no se observó que la disponibilidad de N se relacionara a los cambios en desnitrificación y fijación. La estructura de las comunidades de *Eubacteria* y fijadores de N en vida libre fueron controladas esencialmente por el manejo, mientras que la diversidad de desnitrificantes y nitrificantes dependió tanto del manejo como de la especie vegetal. Para cada grupo funcional, los cambios en la actividad enzimática no se correlacionaron a los cambios en la estructura genética en general, pero el 60% de la varianza en la actividad se correlacionó a cambios en 5 bandas de RFLP o DGGE (Patra *et al.* 2006).

La diversidad de bacterias nitrificantes fue evaluada también en praderas de Escocia con distintas intensidades de manejo, combinando pastoreo por ovinos y agregado de fertilizantes. Las poblaciones de oxidantes de amonio, estudiadas por DGGE del ADNr 16S específico de este grupo y del gen *amoA*, fueron más diversas en los suelos sin manejo que en los suelos mejorados (Webster *et al.*, 2002). Sin embargo, en este trabajo no puede diferenciarse el efecto causado por el pastoreo del debido a la fertilización.

Le Roux *et al.* (2008) estudiaron la influencia de cambios en el manejo de praderas sobre la dinámica de la nitrificación y sobre la abundancia de bacterias y arqueobacterias nitrificantes. En experimentos de mesocosmos, utilizando suelo de pradera sometida 15 años a pastoreo ovino intensivo, se compararon 4 tratamientos: pastoreo o no luego de 1 año con o sin pastoreo (simulado por poda y agregado de orina artificial). La actividad y abundancia de nitrificantes fue mayor con pastoreo continuo que sin pastoreo, y la comunidad de eubacterias nitrificantes fue diferente entre estos tratamientos. El pastoreo llevó a un cambio de esta comunidad en menos de 5 meses, y en los 7 meses siguientes aumentó la actividad y abundancia de nitrificantes, indicando que hubo una selección de bacterias adaptadas a las nuevas condiciones ambientales. Por el contrario, el cese de pastoreo llevó a una disminución en la actividad y abundancia de este grupo en 5 meses y en los 7 meses siguientes hubo un cambio en la comunidad de eubacterias nitrificantes, debido probablemente a una reducción del número

original por falta de nutrientes. Luego de 1 año, la actividad del tratamiento donde se agregó pastoreo fue igual que en el pastoreo continuo y lo mismo para el cese de pastoreo. Estos resultados mostraron que los nitrificantes responden rápido a cambios en el manejo (Le Roux *et al.*, 2008).

Resultados contrastantes con los anteriores se obtuvieron en un estudio realizado en el Chaco (noroeste argentino), donde se midieron cambios en las características del suelo, la disponibilidad de nutrientes y la actividad microbiana en tres sitios con distinta situación de pastoreo: i) exclusión por 20 años; ii) exclusión por 8 años; iii) sobrepastoreo. La actividad (medida como respiración) y densidad microbianas de nitrificantes, amonificantes, fijadores de N en vida libre y celulolíticos fueron menores en el sitio pastoreado, donde las variaciones estacionales fueron mayores. Al aumentar la intensidad del pastoreo otros parámetros que disminuyeron fueron humedad del suelo, materia orgánica y contenido en nitrógeno, mientras que la salinidad aumentó. Los autores sugieren una fuerte influencia del sobrepastoreo sobre la fertilidad así como en la capacidad del suelo para amortiguar el estrés hídrico durante la estación seca (Abril y Bucher, 1999).

En el estudio de Glencoe, se observó una tendencia opuesta de las variables humedad, C orgánico y N total, las cuales presentaron valores mayores en la pradera con pastoreo. Las discrepancias pueden deberse a las diferencias en el tipo de suelo de los diferentes estudios y a las diferentes intensidades de pastoreo evaluadas, dado que los efectos observados pueden variar ampliamente en situaciones de pastoreo moderado o sobrepastoreo.

De todas formas, los trabajos existentes muestran que el pastoreo afecta a los grupos microbianos responsables del ciclo del nitrógeno en suelos de pradera, tanto en aspectos fisiológicos como estructurales. Es probable que los efectos puramente fisiológicos sean más fácilmente reversibles que los cambios en la composición de la comunidad debidos a la intensificación/desintensificación en el manejo de praderas. Estos cambios en la composición de la microbiota del suelo pueden a su vez modificar la respuesta del sistema suelo a perturbaciones adicionales (Griffiths *et al.*, 2000; Patra *et al.*, 2005).

## **5.2. Pastoreo en praderas: efectos sobre las micorrizas**

Existen bastantes estudios que evalúan el efecto del pastoreo sobre los hongos micorríticos. Los vertebrados terrestres pueden afectar a estos microorganismos directa o indirectamente. Directamente, influyendo en la abundancia y diversidad de las esporas mediante su ingesta y eliminación en las heces, luego de lo cual permanecen viables y en algunos casos se estimula su germinación. Indirectamente, pueden alterar la producción de esporas o el potencial de

inóculo por efectos sobre las plantas o los nutrientes del suelo: alterando la colonización micorrítica de las plantas pastoreadas, aportando nutrientes en orina y heces (reduciendo así la colonización en ciertos lugares) o alterando la distribución del inóculo por modificaciones físicas del suelo (por cavado o pisoteo). Además, la herbivoría selectiva puede llevar a cambios en la composición de la comunidad de plantas huéspedes que a su vez puede alterar la abundancia y diversidad de las micorrizas (Gehring *et al.*, 2002).

Estas consideraciones también serían válidas para otros microorganismos del suelo, teniendo en cuenta que sus asociaciones con las plantas pueden ser menos estrechas que en la simbiosis planta-micorriza.

La mayoría de los estudios de interacciones entre herbívoros-plantas-micorrizas se han enfocado en el efecto de la herbivoría sobre la colonización de las raíces por las micorrizas, o en la presencia de hongos micorríticos en plantas luego de la defoliación. El grupo de Frank *et al.* (2003), sin embargo, examinó la variación en la composición microbiana del suelo en una pradera del Parque Nacional Yellowstone (EE.UU.) analizando el efecto de esta variación sobre el crecimiento en invernáculo del pasto dominante de la comunidad (*Poa pratensis*). Éste fue mayor en suelo inoculado con las comunidades microbianas provenientes de la pradera pastoreada que en suelo con las comunidades de la exclusión de ungulados migratorios (ciervos y antílopes) por 40 años, indicando que las comunidades difieren y que esta diferencia influyó en el crecimiento de esa gramínea. El tratamiento del suelo con un fungicida suprimió esta influencia, indicando que era causada por comunidades fúngicas. Estos autores encontraron además que el suelo sometido a pastoreo presentó mayor abundancia, riqueza de especies y diversidad (H) de esporas de micorrizas arbusculares, y no evidenciaron la presencia de hongos patógenos (Frank *et al.*, 2003). En un estudio anterior se encontró que el pastoreo estimula la producción radicular, y esta mayor asignación de energía hacia el suelo favorecería la simbiosis micorrítica, facilitando la toma de nutrientes y el rebrote después del pastoreo (Frank *et al.*, 2002). Sin embargo, estos autores no descartan la importancia de las bacterias del suelo en este fenómeno, ya que no estudiaron la composición bacteriana y desconocen si difiere entre los dos suelos (Frank *et al.*, 2003).

En un estudio realizado en otras praderas, se observó que el pastoreo intenso y moderado aumentó la colonización radicular por micorrizas, sugiriendo que la defoliación altera los recursos vegetales estimulando el desarrollo de la simbiosis micorrítica. Al igual que en el trabajo anterior, se demostró que los mamíferos cambiaron la composición de especies de las comunidades de micorrizas, aunque el ganado redujo la diversidad de las esporas en lugar de aumentarla (Eom *et al.*, 2001). Estos efectos opuestos son difíciles de interpretar dado que ambos hábitats difieren en el tipo de herbívoros, pastos y micorrizas, el tiempo e intensidad del pastoreo y probablemente en los parámetros abióticos del suelo (Frank *et al.*, 2003). Los

cambios en la composición de especies fúngicas y en la diversidad también indican que la defoliación, o alteración del microambiente del suelo por los herbívoros, favorece ciertas especies de hongos micorrízicos adaptados a estas condiciones. Estos resultados muestran que los herbívoros pueden afectar a las plantas de pradera indirectamente a través de alteraciones en las comunidades del suelo y en la simbiosis con micorrizas (Eom *et al.*, 2001).

## 6.1. Procesos asociados al pastoreo: defoliación

Un impacto directo de la herbivoría es la acción de los animales sobre las plantas, produciendo su defoliación. Experimentos en laboratorio con pastos provenientes de praderas del Serengeti (Tanzania) han mostrado que el crecimiento de raíz disminuye con el recorte de las plantas (Ruess y Seagle, 1994), lo cual puede afectar la liberación de nutrientes al suelo por la planta. En estudios de laboratorio se observó un aumento de la biomasa microbiana y de las bacterias cultivables en respuesta a la defoliación de *ryegrass* y trébol. El número de *Pseudomonas* spp. también aumentó con la defoliación, mientras que no se observó un efecto sobre las poblaciones de hongos cultivables ni sobre la actividad microbiana (Mawdsley y Bardgett, 1997).

En el presente trabajo, en la única estación donde se observaron diferencias significativas en la abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes (otoño de 2006), se registró una disminución de estas bacterias asociada al pastoreo.

Se considera generalmente que este grupo de bacterias zimógenas muestra una respuesta rápida a cualquier modificación en los nutrientes disponibles, tales como los que ocurren en la rizósfera frente al resto del suelo, o los debidos a cambios en el patrón de exudados radiculares con la edad de la planta (Mawdsley y Bardgett, 1997).

Tal vez la rápida respuesta de este grupo de bacterias sea la causa de la gran variabilidad entre las repeticiones observada en los recuentos (mayor SD<sup>5</sup> que en los otros grupos bacterianos) y en los patrones de DGGE. Probablemente sean más sensibles a cambios a corto plazo y no reflejen perturbaciones a largo plazo como la que se quiso evaluar en este estudio.

Sin embargo, se ha sugerido que la importancia de las *Pseudomonas* spp. como componentes principales de la microflora rizosférica puede estar sobrevalorada debido al uso de medios de cultivo que seleccionan preferentemente los organismos zimógenos de crecimiento rápido. Estos autores plantean que aunque no hay duda que las *Pseudomonas* utilizan un amplio rango de compuestos presentes en los exudados radiculares y están presentes en números

---

<sup>5</sup> SD: desvío estándar (del inglés: *standard deviation*)

significativos en la rizósfera, grupos de bacterias tales como Actinomycetes y corineformes (no estudiados por ellos) podrían tener igual importancia (Mawdsley y Bardgett, 1997).

En esta tesis se incluyó la determinación de la abundancia de actinobacterias, la cuál resultó mayor en la pradera con pastoreo respecto a las exclusiones, en 3 de las estaciones muestreadas. De todas formas, existió una correlación positiva significativa entre la abundancia de actinobacterias y *Pseudomonas* fluorescentes.

## 6.2. Procesos asociados al pastoreo: aporte de orina y heces

La deposición de heces por el ganado sobre las pasturas aporta nutrientes, C, N y microorganismos de la microflora del intestino (Frostegard *et al.*, 1997). La distribución no homogénea del estiércol lleva a “hot spots” de fertilidad del suelo y actividad microbiana. Además, la bosta directamente sobre el suelo crea un microambiente anaeróbico que afecta la comunidad microbiana y causa fluctuaciones en la respiración. Por otra parte, la deposición de orina es una fuente importante de nitrógeno en las praderas pastoreadas (Sutanto, 2005) y también puede causar cambios locales en la concentración de nutrientes, siendo una fuente de heterogeneidad en la estructura de la comunidad microbiana (Nunan *et al.*, 2006).

La dinámica de la comunidad microbiana asociada al agregado de estiércol al suelo se estudió utilizando un modelo especialmente diseñado, durante 3 semanas de incubación. La biomasa microbiana (medida por PLFA) se duplicó luego de 3 días dentro de los 2 mm de la interfase suelo-abono. Este aumento estuvo acompañado por cambios en la composición de los PLFA, indicando cambios en la estructura de la comunidad microbiana. Estos cambios fueron atribuidos principalmente a la difusión de carbono orgánico desde la bosta. La dinámica de PLFA individuales mostró que durante el crecimiento ocurrieron cambios tanto taxonómicos como fisiológicos: cambió la relación entre PLFA bacterianos y eucarióticos, y disminuyó la relación de ciertos ácidos grasos frente a sus precursores indicando una comunidad bacteriana más activa (Fostergard *et al.*, 1997).

En pasturas de West Virginia (EE.UU.) se determinó que el efecto del agregado de estiércol de vaca medido con varios indicadores biológicos (C en la biomasa microbiana del suelo, C soluble, N potencialmente mineralizable y respiración microbiana *in situ*) fue efímero y más importante en la superficie del suelo. De los indicadores biológicos utilizados en este estudio, el C soluble (HWC: *hot water extractable carbon*) aportó la mejor separación entre los tratamientos del suelo. Dado que el ecosistema de suelos de pasturas es complejo, puede tener una alta resiliencia inherente y buena capacidad para soportar perturbaciones. Los

cambios en la comunidad debidos al impacto a corto plazo del agregado de estiércol fueron detectados por CLPP (perfil fisiológico a nivel de la comunidad), mientras que por análisis con DGGE del ADNr 16S se observó que las comunidades bacterianas del suelo variaron principalmente con la fecha de muestreo y el nivel de fertilidad (Sutanto, 2005).

En praderas sub-alpinas se determinaron los efectos del manejo agrícola (producción de fardos y fertilización con estiércol) comparando las propiedades microbianas del suelo con sitios adyacentes abandonados por 8, 10 o 30 años. La biomasa microbiana, medida como el contenido de PLFA, fue menor en praderas abandonadas que con manejo. Además, el abandono tuvo efectos importantes sobre la estructura de la biomasa microbiana del suelo, produciendo un aumento en la biomasa fúngica (evaluada por PLFA y por contenido de ergosterol). La cantidad del PLFA indicador de actinomicetes fue afectado significativamente por el sitio pero no por el tipo de manejo. Este ácido graso fue mayor en el sitio con alto contenido en C total y relación C/N. Es posible que el aumento en actinomicetes estuviera favorecido por el alto contenido en materia orgánica con baja cantidad de N, dado que estos organismos son capaces de degradar sustancias con alta resistencia al ataque microbiano. Estos autores concluyeron que el impacto del manejo fue relativamente menos importante que los efectos del sitio y el momento de muestreo (Zeller *et al.*, 2001).

Piao *et al.* (2008) compararon la diversidad y estructura de la comunidad de actinobacterias en suelos tratados o no con estiércol por 25 años. En suelos con diferentes enmiendas (fertilizantes con N, P y K; paja y N; estiércol solo y estiércol más NPK) no se observaron diferencias entre las comunidades de bacterias analizadas por DGGE del ADNr 16S con cebadores generales. Tampoco se observaron cambios sustanciales en la comunidad a lo largo del tiempo (abril y julio). Sí se registraron diferencias entre las bibliotecas de clones específicas de actinobacterias, pero no en los índices de diversidad de estas comunidades, sugiriendo que las enmiendas no alteraron la diversidad filogenética en general pero sí la estructura de la comunidad. Estos resultados demostraron la ventaja de los análisis de comunidades específicas de grupo sobre los análisis de la comunidad en general para revelar el impacto de enmiendas del suelo sobre comunidades muy complejas (Piao *et al.*, 2008).

En el caso del presente trabajo, la comunidad específica estudiada (*Pseudomonas fluorescens*) resultó ser demasiado variable como para detectar diferencias entre los tratamientos, que sí se identificaron por análisis del ADN 16S de *Eubacteria*. Se intentó evaluar también la diversidad de otras comunidades específicas (*Bacillus* spp. y *Actinobacteria*) pero no se logró una amplificación satisfactoria como para su análisis por DGGE.

Se han investigado los efectos del agregado de orina de oveja sintética sobre la comunidad microbiana en suelos de pradera de Escocia. La cantidad de bacterias cultivables aumentó, pero no se observaron efectos sobre el número de *Pseudomonas*, hongos ni levaduras (Williams *et al.*, 2000; Nunan *et al.* 2006). Datos de PLFA sugirieron que el tratamiento con orina no tuvo efecto significativo sobre la biomasa microbiana, bacteriana ni fúngica (Nunan *et al.* 2006). Sin embargo, sí se observaron cambios en la estructura de la comunidad microbiana tanto por PLFA como por DGGE del ADNr 16S. Los datos de PLFA sugirieron que la orina sintética indujo un cambio hacia comunidades con mayores concentraciones de ácidos grasos ramificados. Los patrones de bandas de DGGE de los suelos tratados presentaron una mayor proporción de secuencias de ADN que migraron hasta las regiones superiores del gel respecto al control. Los scores del análisis de componentes principales de los resultados del DGGE no estuvieron correlacionados con el pH, la humedad, ni las concentraciones de amonio o nitrato. Los cambios en la estructura de la comunidad medidos por ambas técnicas estuvieron correlacionados significativamente entre sí, sugiriendo que ambos conjuntos de datos reflejan los mismos cambios en las comunidades microbianas (Nunan *et al.*, 2006). El tratamiento con orina estimuló la respiración basal y el uso de fuentes de C presentes en la rizósfera, (determinado por análisis del CLPP), pero no cambió la cantidad de C en la biomasa (Williams *et al.*, 2000; Nunan *et al.*, 2006).

Los cambios causados por el agregado de orina sintética fueron responsables sólo del 10-15% de la variabilidad total de la estructura de la comunidad (evaluada usando métodos de *fingerprinting* bioquímico, fisiológico, y molecular), sugiriendo que la estructura general se mantuvo relativamente estable y los cambios estuvieron confinados a una pequeña proporción de la comunidad (Nunan *et al.*, 2006).

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis aportan conocimiento sobre las bacterias presentes en suelos de pradera natural de nuestro país. Se determinó que el pastoreo por bovinos produjo cambios en el tamaño y composición de la comunidad bacteriana en un suelo de pradera.

Se observó un aumento de la población cultivable de *Actinobacteria* en respuesta al pastoreo. En varios estudios se han visto alteraciones en la abundancia de este grupo en respuesta al pastoreo o a otras perturbaciones, mientras que presentan poca variación en función de los cambios estacionales (Gomes *et al.*, 2001). Este grupo de bacterias podría ser utilizado en algunos casos como un indicador sensible a cambios en las condiciones del suelo.

Los indicadores deben ser sensibles a variaciones de largo plazo, pero resistentes a fluctuaciones de corto plazo. Es difícil encontrar un grupo de mediciones que alcancen este ideal, debido a las complejas interacciones que existen en el suelo (Sutanto, 2005).

La técnica de PCR-DGGE del ADNr 16S de *Eubacteria* resultó apropiada para detectar cambios en la estructura de la comunidad debidos al efecto del pastoreo. Los valores de IDM (Impacto en la Diversidad Microbiana) calculados a partir del análisis de diversidad evidenciaron un claro impacto del pastoreo sobre este dominio.

Se observó una mayor variabilidad de los resultados obtenidos en primavera que en los de otoño. En esta última estación fue donde se constataron los cambios en abundancia y estructura de las comunidades relacionados al pastoreo.

Además de cambios en la diversidad microbiana debidos al pastoreo, en otros estudios se han detectado alteraciones en su actividad. Las implicancias ecológicas de estos cambios se desconocen. Sin embargo, es probable que la dinámica de la materia orgánica y el suministro de nutrientes en el suelo se vean afectados (Bardgett *et al.*, 2001; Clegg, 2006). Existe un cuerpo creciente de evidencia que indica que la composición microbiana de suelo puede tener efectos importantes sobre la composición, diversidad y productividad vegetal (Frank *et al.*, 2003). Se necesitan más estudios para entender los mecanismos de estos cambios en la biota del suelo y su importancia en relación a la descomposición de la materia orgánica y el ciclado de nutrientes, y por consiguiente el funcionamiento de los ecosistemas de pradera (Bardgett *et al.*, 2001).

Las evidencias disponibles muestran que el uso de las praderas naturales modifica profundamente distintos aspectos de su estructura y funcionamiento, lo cual afecta la capacidad del ecosistema más abundante de nuestro país de proveer servicios ecosistémicos básicos. La caracterización de este impacto es necesaria para anticipar las consecuencias del reemplazo de las praderas naturales (Altesor, 2002).

## REFERENCIAS

---

- A**bril, A. y E.H. Bucher. 1999. The effects of overgrazing on soil microbial community and fertility in the Chaco dry savannas of Argentina. *Applied Soil Ecology*. **12**:159-167.
- Aboim, M.C.R., H.L.C. Coutinho, R.S. Peixoto, J.C. Barbosa, A.S. Rosado. 2008. Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-and-burn cultivation system in Southeastern Brazil. *Applied Soil Ecology*. **38**:100-108.
- Abril A. y E.H. Bucher. 1999. The effects of overgrazing on soil microbial community and fertility in the Chaco dry savannas of Argentina. *Applied Soil Ecology*. **12**:159-167.
- Altesor, A. 2002. ¿Cuánto y cómo modificamos nuestras praderas naturales? Una perspectiva ecológica. **En:** A. Domínguez y R.G. Prieto (eds.). *Perfil Ambiental del Uruguay / 2002*. Nordan Comunidad. Montevideo, Uruguay. p. 57-67.
- Altesor, A., M. Oesterheld, E. Leoni, F. Lezama y C. Rodríguez. 2005. Effect of grazing on community structure and productivity of a Uruguayan grassland. *Plant Ecology*. **179**:83-91.
- B**akker, C., J.M. Blair y A.K. Knapp. 2003. Does resource availability, resource heterogeneity or species turnover mediate changes in plant species richness in grazed grasslands? *Oecologia*. **137**:385-391.
- Bardgett, R.D., J.B. Whittaker y J.C. Frankland. 1993a. The effect of collembolan grazing on fungal activity in differently managed upland pastures: a microcosm study. *Biology and Fertility of Soils*. **16**:255-262.
- Bardgett, R.D., J.C. Frankland y J.B. Whittaker. 1993b. The effects of agricultural management on the soil biota of some upland grasslands. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **45**:25-45.
- Bardgett, R.D. y D.K. Leemans. 1995. The short-term effects of cessation of fertilizer applications, liming and grazing on microbial biomass and activity in a reseeded upland grassland soil. *Biology and Fertility of Soils*. **19**:148-154.
- Bardgett, R.D., P.J. Hobbs y Å. Frostegård. 1996. Changes in soil fungal-to-bacterial ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils*. **22**:261-264.
- Bardgett, R.D., D.K. Leemans, R. Cook y P.J. Hobbs. 1997. Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*. **29**:1285-1294.
- Bardgett, R.D. y E. Mc Alister. 1999. The measurement of soil fungal:bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate grasslands. *Biology and Fertility of Soils*. **29**:282-290.
- Bardgett, R.D., J.L. Mawdsley, S. Edwards, P.J. Jobbs, J.S. Rodwell y W.J. Davies. 1999. Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of temperate upland grasslands. *Functional Ecology*. **13**:650-660.
- Bardgett, R.D., A.C. Jones, D.L. Jones, S.J. Kemitt, R. Cook y P.J. Hobbs. 2001. Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*. **33**:1653-1664.
- Beare, M.H., D.C. Coleman, D.A. Crossley Jr, P.F. Hendrix y E.P. Odum. 1995. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil*. **170**:5-22.
- Berge, O., M. Guinebretière, W. Achouak., P. Normand y T. Heulin. 2002. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **52**:607-616.
- Blair, J.M., P.J. Bohlen y D.W. Freckman. 1996. Soil invertebrates as indicators of soil quality. **En:** *Methods for assessing soil quality*. SSSA, Madison WI. Special Publication 49. p. 273-291.
- Buckley, D.H. y T.M. Schmidt. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agroecosystems. *Environmental Microbiology*. **5**:441-452.
- C**arrasco, L. 2003. Evaluación de los cambios estructurales y funcionales de ecosistemas microbianos edáficos provocados por la forestación de praderas uruguayas. *Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales*. Universidad de Concepción, Chile.
- Clegg, C.D. 2006. Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Applied Soil Ecology*. **31**:73-82.
- D**íaz, R. 2003. 40 años de rotaciones - Introducción a la actividad experimental. **En:** *40 años de rotaciones agrícolas-ganaderas*. INIA, Montevideo. Serie Técnica N° 134:IX-XIII.

- Doran, J.W., M. Sarrantonio y M. Liebig. 1996. Soil health and sustainability. **En:** D.L. Spark (ed.). *Advances in Agronomy*. Vol. 56. Academic Press. San Diego, CA. p. 1-54.
- Doran, J.W. y M.R. Zeiss. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*. **15**:3-11.

- E**lkoca, E., F. Kantar y F. Sahin. 2008. Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition*. **31**:157-171.
- Ellis, R.J., P. Morgan, A.J. Weightman y J.C. Fry. 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**:3223-3230.
- Eom A-H, G.W.T. Wilson y D.C. Hartnett. 2001. Effects of ungulate grazers on arbuscular mycorrhizal symbiosis and fungal community structure in tallgrass prairie. *Mycologia*. **93**:233-242.
- Evans, F.F, L. Seldin, G.V. Sebastian, S. Kjelleberg, C. Holmström, and A.S. Rosado. 2004. Influence of petroleum contamination and biostimulation treatment on the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based-PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*. **38**:93-98.

- F**ernández, A., L. Ferrando, J. Menes y S. Tarlera. 2003. Microbial processes and populations as indicators of sustainable rice production. *3ª Conferencia Internacional de Arroz de Clima Templado*. Punta del Este, Uruguay.
- Ferrando, L. y S. Tarlera. 2003. Actividad y estructura de la comunidad de bacterias oxidantes de metano presente en un ecosistema arrocerero. *VI Encuentro Nacional de Microbiólogos*. Montevideo, Uruguay. p. 86.
- Frank, D.A. y P.M. Groffman. 1998. Denitrification in a semi-arid grazing ecosystem. *Oecologia*. **117**:564-569.
- Frank, D.A., P.M. Groffman, R.D. Evans y B.F. Tracy. 2000. Ungulate stimulation of nitrogen cycling and retention in Yellowstone Park grasslands. *Oecologia*. **123**:116-121.
- Frank, D.A., M.M. Kuns y D.R. Guido. 2002. Consumer control of grassland plant production. *Ecology*. **83**:602-606.
- Frank, D.A., C.A. Gehring, L. Machut y M. Phillips. 2003. Soil community composition and the regulation of grazed temperate grassland. *Oecologia*. **137**:603-609.
- Frióni, L. 2006. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Frostegård, Å., S.O. Petersen, E. Bååth y T.H. Nielsen. 1997. Dynamics of a microbial community associated with manure hot spots as revealed by phospholipid fatty acid analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**:2224-2231.

- G**arbeva, P., J.A. van Veen and J.D. van Elsas. 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*. **45**:302-316.
- García, A. y A. Morón. 1992. Estudios de C, N y P en la biomasa microbiana del suelo en tres sistemas de rotación agrícola. *Investigaciones Agronómicas*. **1**:111-126.
- Geels F.P. y B. Schippers. 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathologische Zeitschrift*. **108**:193-206.
- Gehring, C.A., J.E. Wolf y T.C. Theimer. 2002. Terrestrial vertebrates promote arbuscular mycorrhizal fungal diversity and inoculum potential in a rain forest soil. *Ecology Letters*. **5**:540-548.
- Georgiadis, N.J., R.W. Ruess, S.J. McNaughton y D. Western. 1989. Ecological conditions that determine when grazing stimulates grass production. *Oecologia*. **81**:316-322.
- Gomes, N.C.M, H. Heuer, J. Schönfeld, R. Costa, L. Mendonça-Hagler y K. Smalla. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*. **232**:167-180.
- Gould, W.D., C. Hagedorn, T.R. Bardinelli y R.M. Zablotowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Applied and Environmental Microbiology*. **49**:28-32.
- Griffiths, B.S., K. Ritz, R.D. Bardgett, R. Cook, S. Christensen, F. Ekelund, S.J. Sørensen, E. Baath, J. Bloem, P.C. de Ruiter, J. Dolfing y B. Nicolardot. 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos*. **90**:279-294.

Griffiths, R.I., A.S. Whiteley, A.G. O'Donnell y M.J. Bailey. 2003. Physiology and community responses of established grasslands bacterial populations to water stress. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**:6961-6968.

**H**atayama, K., S. Kawai, H. Shoun, Y. Ueda y A. Nakamura. 2005. *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **55**:1539-1544.

Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, and E.M.H. Wellington. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**:3233-3241.

Holland, E.A. y J.K. Detling. 1990. Plant response to herbivory and belowground nitrogen cycling. *Ecology*. **71**:1040-1049.

Hunter-Cevera, J.C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*. **1**:278-285.

**I**nforme final del proyecto PDT 29/108. Evaluación de la biodiversidad en suelos bajo diferentes sistemas de producción. Responsable científico: Alicia Arias. 2004-2007.

**J**anssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**:1719-1728.

Johnsen, K. y P. Nielsen. 1999. Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation. *FEMS Microbiology Letters*. **173**:155-162.

Johnson, M.J., K.Y. Lee y K.M. Scow. 2003. DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*. **114**:279-303.

**K**ennedy, A.C. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **74**:65-76.

Kennedy, A.C. y K.L. Smith. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*. **170**:75-86.

Kennedy, A.C., T.L. Stubbs y W.F. Schillinger. 2004. Soil and crop management effects on soil microbiology. **En**: Soil organic matter in sustainable agriculture. F. Magdoff y R.R. Weil. (Eds). CRC Press. Boca Raton, FL, EE.UU. p. 295-326.

Kieft, T.L. 1994. Grazing and plant-canopy effects on semiarid soil microbial biomass and respiration. *Biology and Fertility of Soils*. **18**:155-162.

King E.O., M.K Ward y D.E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **44**:301-307.

Kirk, J.L., L.A. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J.N. Klironomos, H. Lee y J.T. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. **58**:169-188.

Kloepper, J.W. 1995. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). **En**: Y. Okon (ed.). *Azospirillum/Plant Associations*. CRC Press, Boca Raton. p. 137-166.

Kowalchuk, G.A., D.S. Buma, W. de Boer, P.G. Klinkhamer y J.A. van Veen. 2002. Effects of aboveground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **81**:509-520.

Kuske, C.R., L.O. Ticknor, M.E. Miller, J.M. Dunbar, J.A. Davis, S.M. Barns y J. Belnap. 2002. Comparison of soil bacterial communities in the rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:1854-1863.

**L**atour, X., T. Corberand, G. Laguerre, F. Allard y P. Lemanceau. 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**:2449-2456.

Le Roux, X., M. Bardy, P. Loiseau y F. Louault. 2003. Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: do changes in plant species composition matter? *Oecologia*. **137**:417-425.

Le Roux, X., F. Poly, P. Currey, C. Commeaux, B. Hai, G.W. Nicol, J.I. Prosser, M. Schlöter, E. Attard y K. Klumpp. 2008. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *The ISME Journal*. **2**:221-232.

Leoni, C. y R. Ghini. 2003. Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. *Fitopatologia Brasileira*. **28**:67-75.

- Linden, E.R., P.F. Hendrick, D.C. Coleman y P.C.J. van Vliet. 1994. Faunal indicators of soil quality. **En:** J.W. Doran, D.C. Coleman, D.F. Bezdicek y B.A. Stewart (eds.). *Defining soil quality for sustainable environment*. SSSA, Madison WI. Special Publication 35. p. 91-105.
- Liu, X., W.C. Lindemann, W.G. Whitford y R.L. Steiner. 2000. Microbial diversity and activity of disturbed soil in the northern Chihuahuan Desert. *Biology and Fertility of Soils*. **32**:243-249.

- M**awdsley J.L. y R.D. Bardgett. 1997. Continuous defoliation of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens*) and associated changes in the microbial population of an upland grassland soil. *Biology and Fertility of Soils*. **24**:52-58.
- McCaig, A.E., L.A. Glover y J.I. Prosser. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. **47**:4554-4559.
- Mc Caig, A.E., S.J. Grayston, J.I. Prosser y L.A. Glover. 2001. Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. **35**:37-48.
- Mc Naughton, S.J., L.L. Wallace y M.B. Coughenour. 1983. Plant adaptation in an ecosystem context: effects of defoliation, nitrogen, and water on growth of an African C<sub>4</sub> sedge. *Ecology*. **64**:307-318.
- McNaughton, S.J., F.F. Banyikwa, M.M. McNaughton. 1997. Promotion of the cycling of diet-enhancing nutrients by African grazers. *Science*. **278**:1798-1800.
- Miethling, R., G. Wieland, H. Backhaus y C.C. Tebbe. 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology*. **40**:43-56.
- Mirza, M.S., S. Mehnaz, P. Normand, C. Prigent-Combaret, Y. Moëgne-Loccoz, R. Bally y K.A. Malik. 2006. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biology and Fertility of Soils*. **43**:163-170.
- Morón, A. y J. Sawchick. 2002. Soil quality indicators in long-term crop-pasture rotation experiment in Uruguay. **En:** Symposium nº 32, 17<sup>th</sup> WCSS, Thailand. p. 1327.
- Muyzer, G., E.C. de Waal y A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. **59**:695-700.

- N**übel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R.I. Amann, W. Ludwig y H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. **178**:5636-5643.
- Nunan, N., B. Singh, E. Reid, B. Ord, A. Papert, J. Squires, J.I. Prosser, R.E. Wheatley, J. Mc Nicol y P. Millard. 2006. Sheep-urine-induced changes in soil microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology*. **56**:310-320.

- Ö**hlinger, R. 1996. Soil sampling and sample preparation. **En:** F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler y R. Margesin (eds.). *Methods in soil biology*. Springer-Verlag. Berlin/Heidelberg, Alemania. p. 7-11.
- Ohtonen, R. y H. Väre, 1998. Vegetation composition determines microbial activities in a boreal forest soil. *Microbial Ecology*. **36**:328-335.
- Øvreås L. y V.V. Torsvik. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*. **36**:303-315.

- P**ankhurst, C.E. 1997. Biodiversity of soil organisms as an indicator of soil health. **En:** C.E. Pankhurst, B.M. Doube y V.V.S.R. Gupta (eds.). *Biological indicators of soil health*. CAB International. Wallingford, UK. p. 297-324.
- Patra, A.K., L. Abbadie, A. Clays-Josserand, V. Degrange, S.J. Grayston, P. Loiseau, F. Louault, S. Mahmood, S. Nazaret, L. Philippot, F. Poly, J.I. Prosser, A. Richaume y X. Le Roux. 2005. Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs*. **75**:65-80.
- Patra, A.K., L. Abbadie, A. Clays-Josserand, V. Degrange, S.J. Grayston, N. Guillaumaud, P. Loiseau, F. Louault, S. Mahmood, S. Nazaret, L. Philippot, F. Poly, J.I. Prosser y X. Le Roux. 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology*. **8**:1005-1016.

- Peixoto, R.S., H.L. da C. Coutinho, N.G. Rumjanek, A. Macrae y A.S. Rosado. 2002. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*. **35**:316–320.
- Peixoto, R.S., H.L.C. Coutinho, B. Madari, P.L.O.A. Machado, N.G. Rumjanek, J.D. van Elsas, L. Seldin, A.S. Rosado. 2006. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. *Soil & Tillage Research*. **90**:16-28.
- Pereyra, C., C. Aguilar, M. Sicardi y L. Frioni. 2003. Actividad microbiológica en suelos bajo sistemas de labranza conservacionista. *VI Encuentro Nacional de Microbiólogos*. Montevideo, Uruguay. p. 89.
- Piao, Z., L. Yang, L. Zhao y S. Yin. 2008. Actinobacterial community structure in soils receiving long-term organic and inorganic amendments. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**:526-530.

- R**itz, K., J.W. McNicol, N. Nunan, S. Grayston, P. Millard, D. Atkinson, A. Gollotte, D. Habeshaw, B. Boag, C.D. Clegg, B.S. Griffiths, R.E. Wheatley, L.A. Glover, A.E. McCaig y J.I. Prosser. 2004. Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in an upland grassland. *FEMS Microbiology Ecology*. **49**:191-205.
- Rodríguez, C., E. Leoni, F. Lezama y A. Altesor. 2003. Temporal trends in species composition and plant traits in natural grasslands of Uruguay. *Journal of Vegetation Science*. **14**:433-440.
- Rondon, M.R., R.M. Goodman y J. Handelsman. 1999. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Tibtech*. **17**:403-409.
- Ruess R.W. y S.J. McNaughton. 1987. Grazing and the dynamics of nutrient and energy regulated microbial processes in the Serengeti grasslands. *Oikos*. **49**:101-110.
- Ruess R.W. y S.W. Searle. 1994. Landscape patterns in soil microbial processes in the Serengeti National Park, Tanzania. *Ecology*. **75**:892-904.

- S**ambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- Seagle S.W., S.J. McNaughton y R.W. Ruess. 1992. Simulated effects of grazing on soil nitrogen and mineralization in contrasting Serengeti grasslands. *Ecology*. **73**:1105-1123.
- Schinner, F. 1996. Introduction. **En:** F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler y R. Margesin (eds.). *Methods in soil biology*. Springer-Verlag. Berlin/Heidelberg, Alemania. p. 3-6.
- Schinner, F., R. Öhlinger, E. Kandeler y R. Margesin (eds.). 1996. Community structure of soil microorganisms. **En:** *Methods in soil biology*. Springer-Verlag. Berlin/Heidelberg, Alemania. p. 76-80.
- Schmalenberger, A. y C.C. Tebbe. 2003. Bacterial diversity in maize rhizosphere: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*. **12**:251-262.
- Schouten, A., G. van den Berg, V. Edel-Hermann, C. Steinberg, N. Gautheron, C. Alabouvette, C.H. Ric de Vos, P. Lemanceau y J.M. Raaijmakers. 2004. Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **17**:1201-1211.
- Sicardi, M., F. García Préchac y L. Frioni. 2003. Indicadores biológicos del suelo sensibles a cambios de pasturas a plantaciones comerciales de *Eucalyptus grandis*. *7ª Jornada de Zoología del Uruguay y 1er Encuentro de Ecología del Uruguay*. Montevideo, Uruguay. p. 132.
- Smit, E., P. Leeflansg, S. Gommans, J. van den Broek, S. van Mil y K. Wernars. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**:2284-2291.
- Stach, J.E.M., L.A. Maldonado, A.C. Ward, M. Goodfellow y A.T. Bull. 2003. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*. **5**:828-841.
- Stevenson, K.E. y W.P. Segner. 1992. Mesophilic aerobic sporeformers. **En:** C. Vanderzant y D.F. Splittstoesser (eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3<sup>rd</sup> Edition. American Public Health Association. p. 265-274.
- Sutanto, Y. 2005. Manure from grazing cattle: effects on soil microbial communities and soil quality in northern West Virginia pastures. MSc Thesis. West Virginia University, EE.UU.

- t**er Braak, C.J.F. y P. Smilauer. 1998. *CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows*. Centre for Biometry Wageningen, The Netherlands.

- Thirup, L., K. Johnsen y A. Winding. 2001. Succession of indigenous *Pseudomonas* spp. and actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54 and the fungicide imazalil. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**:1147-1153.
- Thirup, L., A. Johansen, A. Winding. 2003. Microbial succession in the rhizosphere of live and decomposing barley roots as affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54-BN14 or the fungicide imazalil. *FEMS Microbiology Ecology*. **43**:383-392.
- Tiquia, S.M., J.H.C. Wan y N.F.Y. Tam. 2002. Microbial population dynamics and enzyme activities during composting. *Compost Science and Utilization*. **10**:150-161.
- Travers, R.S., P.A.W. Martin y C.F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**:1263-1266.

- V**aldés, M., N.O. Pérez, P. Estrada-de los Santos, J. Caballero-Mellado, J.J. Peña-Cabrales, P. Normand y A.M. Hirsch. 2005. Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**:460-466.
- van Bruggen, A.H.C. y A.M. Semenov. 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*. **15**:13-24.
- van Elsas, J.D., P. Garbeva y J. Salles. 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.
- Vitousek, P.M., H.A. Mooney, J. Lubchenco y J.M. Melillo. 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science*. **227**:494-499.

- W**ebster, G., T.M. Embley y J.I. Prosser. 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of  $\beta$ -proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:20-30.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. **52**:487-511.
- Widmer, F., R.J. Seidler, P.M. Gillevet, L.S. Watrud, and G.D. Di Giovanni. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**:2545-2553.
- Wieland, G., R. Neumann y H. Backhaus. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**:5849-5854.
- Williams, B.L., S.J. Grayston y E.J. Reid. 2000. Influence of synthetic sheep urine on the microbial biomass, activity and community structure in two pastures in the Scottish uplands. *Plant and Soil*. **225**:175-185.
- Wrage, N., G.L. Velthof, M.L. van Beusichem y O. Oenema. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*. **33**:1723-1732.

- X**u, L.-H., Q.-R. Li y C.-L. Jiang. 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**:244-248.

- Z**eller, V., R.D. Bardgett y U. Tappeiner. 2001. Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. *Soil Biology and Biochemistry*. **33**:639-649.
- Zerbino, M.S. 2005. Evaluación de la densidad, biomasa y diversidad de la macrofauna del suelo en diferentes sistemas de producción. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. UdelaR. Montevideo, Uruguay.