

Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Profundización Microbiología

**USO DE UN ESTIMULANTE BIOLÓGICO EN CULTIVOS
DE SOJA Y CITRUS:
Efectos sobre la comunidad microbiana.**

Estudiante: Agustina Queirolo Isasa

E-mail: queirolo.agustina@gmail.com

C.I: 48063163

Tutora: Natalia Bajsá Valverde
Co-tutora: Daniella Senatore Cruz

Montevideo, Uruguay

2024

Tabla de contenido

Resumen	3
Introducción	4
1. Suelo	4
2. Microorganismos del suelo	4
2.1. <i>Ciclo del nitrógeno y amonificantes:</i>	6
2.3. Actinomycetota	7
2.4. <i>Bacillus spp.</i>	8
2.5. Hongos.....	8
3. Abundancia y actividad microbiana	9
4. Prácticas agrícolas	11
Objetivos	13
1) General.....	13
2) Específicos	13
Hipótesis	13
Materiales y métodos	14
1. Sitios de muestreo	14
1.1 El Repecho	15
1.2 Estación El Timbó y Tres Aguas	16
2. Obtención de muestras de suelo	17
3. Determinación de la humedad	17
4. Análisis microbiológicos.....	17
5. Medida de actividad microbiana por respiración y cálculo	19
6. Análisis de datos.....	21
Resultados	22
1. Abundancia microbiana en suelo.....	22
2. Actividad microbiana en suelo	31
Discusión	33
1. Abundancia de microorganismos cultivables.....	34

2.	Actividad microbiana.....	38
Consideraciones finales.....		39
Anexo.....		40
1.	Medios de cultivo.....	40
2.	Reactivo de Nessler.....	41
3.	Soluciones.....	41
4.	Tablas de Abundancia.....	42
5.	Scripts de R-Studio.....	43
Referencias bibliográficas.....		45

Resumen

El rápido deterioro de los suelos en Uruguay, causado por la intensificación agrícola y el uso extensivo de agroquímicos, subraya la necesidad de adoptar prácticas agrícolas más sostenibles. El objetivo general de este estudio fue evaluar el impacto de un activador biológico comercial (Foliar Blend) junto con la reducción de agroquímicos, sobre la comunidad microbiana del suelo, comparándolo con un manejo convencional que emplea solamente agroquímicos. El activador biológico comercial, que contiene una mezcla de carbohidratos, aminoácidos, micronutrientes quelatados y ácido salicílico, fue aplicado en dos tipos de cultivos: citrus (sitio El Repecho) y soja (sitios Timbó y Tres Aguas). Los tratamientos evaluados incluyeron la aplicación del activador biológico con reducción de agroquímicos, y el uso convencional de agroquímicos, cada uno en tres repeticiones. La abundancia de microorganismos, y la actividad microbiana, medida como respiración, se evaluaron en todos los sitios. En los cultivos de citrus (sitio El Repecho), la abundancia de bacterias amonificantes y de *Pseudomonas* fluorescentes disminuyó significativamente con la aplicación del activador. En soja (sitio Timbó) la abundancia de *Bacillus* spp. aumentó, mientras que la abundancia de hongos filamentosos disminuyó en el tratamiento con el activador. En soja (sitio Tres Aguas), la abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes y de Actinomycetota tuvo un aumento significativo cuando se agregó el activador. No se observaron diferencias significativas en la abundancia de los otros microorganismos estudiados ni en la respiración entre los tratamientos de todos los sitios. Los resultados indican que el activador biológico puede tener efectos variables en la comunidad microbiana, dependiendo del tipo de microorganismo, las características del suelo y otras condiciones específicas. Para obtener una visión más completa de los cambios que pueden ocurrir en la comunidad microbiana del suelo debido a prácticas agrícolas, es recomendable complementar el análisis microbiológico clásico utilizando técnicas moleculares y métodos que evalúen la actividad enzimática del suelo. Las mismas proporcionarán una caracterización más detallada de las comunidades microbianas y sus funciones, ayudando a optimizar el uso del activador biológico y a mejorar las prácticas agrícolas sostenibles.

Introducción

1. Suelo

La palabra suelo se refiere al material exterior suelto que hay en la superficie de la Tierra, una capa distinta de la roca madre subyacente. Es un ecosistema complejo y dinámico, formado por una fracción mineral, materia orgánica, agua y gases que interactúan formando un hábitat que permite el desarrollo de una gran diversidad de organismos (McBratney y Hartemink, 2024). Es un recurso no renovable a escala humana, y es fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas, la producción de alimentos, la reserva genética de organismos y la acumulación de carbono, así como también para el ciclado de nutrientes a nivel global (Abawi y Widmer, 2000).

Un gramo de suelo contiene millones de microorganismos; algunas estimaciones indican que el número de especies en un gramo de suelo puede alcanzar hasta 5000 (Kirk et al., 2004). Los suelos cultivados y de praderas contienen aproximadamente 2×10^9 organismos procariotas por gramo de suelo (Urban, 2008). La fertilidad del suelo no solo depende de su composición química, sino también de la cantidad y calidad de los microorganismos presentes. El mantenimiento de las diversas comunidades biológicas en el suelo es crucial para lograr prácticas de agricultura sostenible (Beare et al., 1995; Benizri et al., 2002).

2. Microorganismos del suelo

Los microorganismos cumplen un rol esencial en el mantenimiento de la vida en nuestro planeta. Los que habitan el suelo son fundamentales para la continuidad de los ciclos biogeoquímicos, para la descomposición de la materia orgánica en moléculas más simples y la formación de los suelos. Asimismo, son muy importantes para mantener la productividad y sostenibilidad de los ecosistemas. También llevan a cabo importantes funciones relacionadas con la supresión de los agentes patógenos, degradación de pesticidas y contaminantes del suelo, por lo que son clave para la salud de las plantas, propiciando la tolerancia de las mismas ante diversas enfermedades y aumentando su resistencia al estrés (Glodowska y Wozniak, 2019). A su vez, sirven como fuente y depósito de nutrientes, solubilizan minerales, fijan nitrógeno atmosférico y también pueden producir hormonas vegetales (Kirk et al., 2004). La biomasa microbiana es uno de

los indicadores más precisos frente al cambio ambiental, incluso más aún que los parámetros físicos y químicos (Kaschuk et al., 2010), por lo que es esencial al momento de evaluar la calidad del suelo (Acosta-Martínez et al., 2008).

Los microorganismos llevan a cabo procesos metabólicos tomando nutrientes del ecosistema para formar nuevas células. A su vez, excretan productos de desecho al ambiente. De este modo, las comunidades microbianas fluctúan en función de los recursos disponibles, las condiciones del entorno y de las diferentes poblaciones de organismos que pueden soportar (Madigan et al., 2015).

Para establecer un buen indicador de la fertilidad del suelo es necesario el estudio de microorganismos, asociados a parámetros físicos y químicos del mismo. Adicionalmente, es necesario el uso de parámetros microbiológicos como ser las poblaciones de mayor sensibilidad a las perturbaciones, entre las cuales se encuentran las de Actinomycetota y de sensibilidad moderada, como ser las bacterias amonificantes (Lupwayi et al., 1998).

Según estudios que implican técnicas dependientes de cultivo, las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Actinomycetota) se encuentran dentro de los géneros de bacterias del suelo más abundantes (Bhattacharyya y Jha, 2011). Además, son conocidas por su potencial como agentes de control biológico. Su antagonismo a ciertos patógenos puede explicarse mediante determinados mecanismos de acción tales como producción de enzimas hidrolíticas, de antibióticos, inducción de resistencia en la planta, o la competencia por nutrientes. Por otra parte, diversas cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* fomentan el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos como son la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales, la liberación de fitohormonas, y la disminución de metales pesados del suelo (Singh et al., 2011). Al mismo tiempo, los hongos son agentes beneficiosos debido a que llevan a cabo procesos de degradación de la materia orgánica compleja, convirtiéndola en formas más simples y dejándola disponible para ser absorbida por otros organismos como las plantas. Además, producen antioxidantes, antibióticos y antifúngicos (Suárez y Peñaranda, 2022).

2.1. Ciclo del nitrógeno y amonificantes:

El nitrógeno (N) es uno de los elementos esenciales de las biomoléculas como el ADN, el ARN, los aminoácidos y las proteínas; se lo puede encontrar en varios estados de oxidación. A pesar de que existe una gran reserva de N en la atmósfera, el 78% se encuentra en forma de N_2 por lo que es inaccesible para la mayoría de los seres vivos, siendo por lo tanto uno de los principales factores limitantes de diversos ecosistemas, afectando además, el crecimiento de los cultivos. Por otra parte, el ciclo del nitrógeno (Figura 1) está muy relacionado a los microorganismos, ya que los mismos llevan adelante pasos únicos y esenciales del mismo (Barrueco et al., 1984).

Las bacterias amonificantes transforman el nitrógeno proveniente de fuentes orgánicas (aminoácidos y nucleótidos), así como también el ácido úrico y la urea, producto de la excreción de determinados organismos, en NH_3 que queda disponible para las reacciones de nitrificación y asimilación.

El nitrógeno entra en la biósfera principalmente por fijación química y biológica del nitrógeno molecular (N_2), y se remueve de la misma manera por desnitrificación (Madigan et al., 2015).

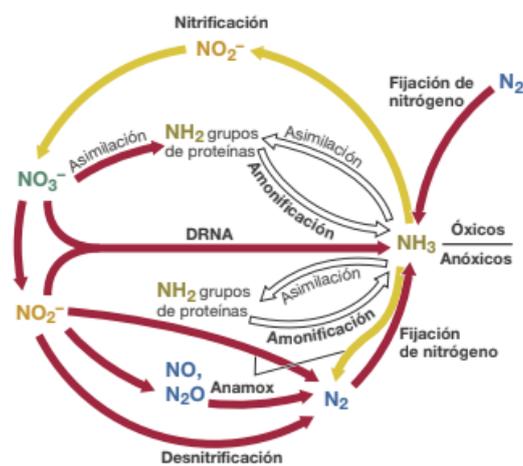


Figura 1: Esquema del Ciclo del Nitrógeno. El flujo de nitrógeno a través de los procesos realizados por las bacterias amonificantes se refleja en la rama de amonificación ($NH_2 \rightarrow NH_3$) (Madigan et al., 2015).

2.2. *Pseudomonas* fluorescentes

El género *Pseudomonas* pertenece al filum Pseudomonadota. Las bacterias de este género tienen como característica común el no formar esporas como estructuras de resistencia. Son bacilos Gram negativos, tienen uno o más de un flagelo polar, son quimioheterótrofas y generalmente aerobias, no fermentativas y móviles (Mishra y Arora, 2018). Se encuentran principalmente en la rizósfera, aunque también pueden hallarse en el agua y en los suelos. Dentro de este género, las *Pseudomonas* fluorescentes se caracterizan por su potencial para controlar enfermedades de las plantas, constituyendo un control biológico de patógenos debido a que producen antifúngicos e inducen el sistema de resistencia de las plantas. Presentan además una gran variedad de mecanismos de promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal (Kennedy, 1999; Bossis et al., 2000; Riera, 2012). Finalmente, se distinguen del resto de las *Pseudomonas* por presentar un pigmento característico soluble, de color amarillo-verdoso, que fluoresce ante la luz ultravioleta, y que corresponde a los sideróforos del tipo pioverdina (Botelho y Mendonça-Hagler, 2006; Álvarez-García et al., 2020).

2.3. Actinomycetota

El filo Actinomycetota es uno de los grupos más grandes del dominio *Bacteria* conformado, en gran parte, por bacterias ambientales de vida libre que se distribuyen de manera ubicua, tanto en ambientes marinos como terrestres, aunque en estos últimos mayoritariamente. Son bacterias Gram positivas, filamentosas, con un gran contenido G+C en su genoma y producen esporas. Son principalmente aerobias, pero existen excepciones. A su vez, fisiológicamente, son bacterias heterótrofas o quimioautótrofas (Barka et al., 2016). Se hallan tanto en la superficie del suelo, como a profundidades mayores a 2 metros. Este filo presenta una gran importancia a nivel biotecnológico, debido a su uso en agricultura, medicina e industria. Del género *Streptomyces* se obtiene un alto porcentaje de los antibióticos de uso médico y veterinario, así como también produce una variada cantidad de metabolitos secundarios con funciones antifúngicas, herbicidas y antitumorales (Omura et al., 2001).

2.4. *Bacillus* spp.

Las bacterias pertenecientes a este género son Gram positivas, móviles, con flagelos largos y aerobias estrictas o facultativas. Principalmente son mesófilas, pero también pueden crecer a bajas o altas temperaturas. Este género se caracteriza por presentar mecanismos de supervivencia ante condiciones físicas desfavorables que implican la esporulación en caso de no poder mantenerse en estado vegetativo. La habilidad de las especies de *Bacillus* de formar endosporas altamente resistentes ofrece una importante ventaja en un ambiente como el suelo (Calvo y Zúñiga, 2010; Giannone, 2015). Producen también una amplia variedad de enzimas extracelulares y antibióticos tales como la gramicidina, bacitracina, polimixina y circulina (Gorgoroso, 2012). Estas bacterias son de suma importancia para los suelos debido a que presentan mecanismos de movilización biológica del fósforo, de producción de fitohormonas y sideróforos, así como de control biológico de ciertos hongos patógenos.

2.5. Hongos

Los hongos forman parte del Reino Fungi. Son organismos eucariotas, presentan núcleo y una membrana nuclear, un retículo endoplásmico, mitocondrias y un aparato secretor. La gran mayoría son aerobios obligados o facultativos. Son quimiótrofos secretores de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos orgánicos en nutrientes solubles que luego son absorbidos pasivamente o integrados a la célula por transporte activo (Suárez y Peñaranda, 2022).

1. **Filamentosos:** La mayoría de los hongos filamentosos se caracterizan por tener un soma vegetativo (talo) similar a las plantas, filamentos microscópicos continuos más o menos alargados y ramificados con paredes celulares definidas, la mayoría, constituidas por quitina, dispuestas en microfibrillas como la celulosa. Además, otros polisacáridos como mananos, galactanos y quitosano reemplazan a la quitina en algunos grupos. Presentan una pared celular formada por carbohidratos (80-90 %), y son las proteínas, los lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos el material adherente (Estrada y Ramírez, 2019; Agrios, 1995).
2. **Levaduras:** La gran mayoría pertenece al filo Ascomycota, debido a que presentan ascos. Son microorganismos eucariotas unicelulares. Es uno de los filos más diversos y ubicuo dentro de los eucariotas y el mayor dentro de los hongos. Sus especies se

distribuyen en casi todos los ambientes, tanto terrestres como acuáticos. Pueden ser uni o pluricelulares, de paredes rígidas (por la presencia de quitina), son heterótrofos (no poseen clorofila), se reproducen sexual y asexualmente, o solo asexualmente (Estrada y Ramírez, 2019).

3. Abundancia y actividad microbiana

Algunos parámetros microbianos como ser la biomasa, la actividad enzimática y la respiración, son aspectos de gran relevancia para la salud del suelo, constituyéndose como eficaces herramientas para el monitoreo de la calidad de los suelos (Dixon y Tilston, 2010).

Las poblaciones de bacterias en el suelo no se distribuyen de forma azarosa. Determinados parámetros como la composición de los suelos, la materia orgánica, el pH, el agua y la disponibilidad de oxígeno, desempeñan un papel importante para dicha distribución (Calvo y Zúñiga, 2010). La abundancia de organismos y su actividad decrece conforme aumenta la profundidad del suelo (Duineveld et al., 2001; Wieland et al., 2001). Consecuentemente, la mayor abundancia de microorganismos se encuentra en la superficie (Beare et al., 1995; Benizri et al., 2002). Asimismo, los suelos presentan variabilidad horizontal en su composición. Esta heterogeneidad descrita en ciertos estudios, se puede relacionar con la presencia de gradientes y variación en las propiedades del suelo, que involucran la agregación, la textura, la densidad, la concentración de O₂, disponibilidad de agua, contenido orgánico, disponibilidad de N y dinámica vegetal (Kennedy, 1999).

Es complejo determinar con precisión la composición de las comunidades microbianas del suelo y su actividad debido a las dificultades que conlleva estudiar los microorganismos que lo habitan. La microbiología clásica implica el aislamiento y el cultivo de microorganismos de un determinado ambiente, empleando diferentes medios de cultivo y regulando las condiciones de crecimiento, dependiendo del organismo que se quiere aislar. Sin embargo, no da cuenta de la vasta diversidad de organismos que habitan un ambiente (Turner et al., 2013). Además, las cepas en estado de dormancia o en estado viable pero no cultivable no son detectadas (Cruz-Leyva et al., 2015). La diversidad microbiana que puede recuperarse a partir de métodos de cultivo estándar se halla por debajo del 1% de la diversidad presente en muestras ambientales complejas como lo es

el suelo. Si bien es posible que ese 1% sea representativo de toda la población, estando el restante 99% fisiológicamente inactivo para su cultivo, también puede suceder que el 99% sea fenotípica y genotípicamente diferente al 1%. Por lo tanto, solamente el 1% de la población estará representada (Hunter-Cevera 1998; Glodowska and Wozniak, 2019).

Mediante las técnicas de microbiología clásica es posible obtener información sobre algunas poblaciones como ser los microorganismos heterótrofos activos (obtienen C a partir de fuentes orgánicas). De igual modo, pero empleando medios de cultivo selectivos, se pueden distinguir diversos organismos de acuerdo a su crecimiento en los mismos o bien cuantificarlos conforme a sus capacidades metabólicas (ej.: bacterias amonificantes). Muchos de estos microorganismos se encuentran involucrados en interacciones con plantas, mediante diversos mecanismos, siendo muchas de ellas beneficiosas para ambos (Kirk et al., 2004; Frioni, 2006).

Por otra parte, la técnica del número más probable (NMP) nos permite estimar de manera indirecta la densidad de una población sin hacer conteo real de microorganismos o colonias. A pesar de que la información generada se restringe solo a las comunidades que pueden ser cultivadas y es sensible a la densidad de inóculo (Cañón-Cortázar et al., 2012) es una técnica rápida y económica que genera información útil para estimar la abundancia de la población microbiana en el suelo, así como también lo es la técnica de recuento en placa.

La actividad microbiana refleja los procesos que ocurren en el suelo debido a la presencia de bacterias y hongos. Es de gran relevancia para el ciclo de nutrientes y para la descomposición de la materia orgánica. La respiración del suelo refleja la actividad metabólica de los microorganismos que habitan el mismo, y se cuantifica mediante la evolución del CO₂. Este parámetro permite evaluar directamente la respiración de los microorganismos presentes en las muestras de suelo y determinar su actividad metabólica. Además, indica la tasa a la que las comunidades microbianas procesan la materia y la energía (Dixon y Tilston, 2010). Se considera un bioindicador eficiente en lo que respecta a las condiciones microbianas, la salud y calidad de los suelos (Glodowska y Wozniak, 2019). Finalmente, para realizar este análisis es necesaria la determinación de la humedad debido a que el agua se requiere para múltiples funciones celulares y es el constituyente de mayor proporción en peso de la célula, por lo tanto determinará el crecimiento microbiano y la producción vegetal. Hay una gran variación en el contenido de

agua del suelo por las condiciones climáticas. La capacidad de los suelos de retener agua en los capilares existentes entre las partículas sólidas, principalmente por adsorción de arcilla y materia orgánica es otra propiedad muy importante que influye en la respiración de las raíces de las plantas y la actividad metabólica de los microorganismos del suelo. La capacidad de campo de un suelo representa el porcentaje de agua que puede retenerse después de dos a tres días de drenaje del agua gravitacional; su valor representa la máxima cantidad de agua disponible para las plantas (Frioni, 2006).

4. Prácticas agrícolas

Ciertas prácticas agrícolas, como ser el uso de fertilizantes químicos, de pesticidas, la rotación de los cultivos y el uso de abonos o biofertilizantes, influyen en la composición, la abundancia y las funciones de las bacterias y de los hongos en los ecosistemas terrestres. (Glodowska y Woźniak, 2019). Pueden afectar también la calidad y la cantidad de materia orgánica disponible en el suelo así como provocar cambios en la entrada de los nutrientes a dicho ecosistema. A su vez, el mal manejo del uso del suelo puede provocar la pérdida de fertilidad del mismo y la disminución en la abundancia de los microorganismos (Morugán-Coronado et al., 2015). El uso de biofertilizantes, de biopesticidas, de inoculantes microbianos y de estimulantes biológicos, presenta ventajas sobre el empleo de otros compuestos tales como los insumos de síntesis química. Dentro de estas ventajas, puede destacarse el hecho de que no sólo son más seguros, sino que también provocan un menor daño ambiental y menor riesgo para la salud humana. Por otra parte, son más efectivos a bajas cantidades y presentan una actividad más dirigida que los otros compuestos (Berg, 2009).

Los estimulantes biológicos son aquellas sustancias (sin ser los pesticidas) que al aplicarse a las hojas, tallos o semillas, en formulaciones específicas, presentan la capacidad de modificar los procesos fisiológicos de las plantas, de una manera potencialmente beneficiosa para las mismas, tanto para el crecimiento como para su desarrollo y/o respuesta frente al estrés (Du Jardin, 2012). Están compuestos de sustancias orgánicas, materiales inorgánicos, y en algunos casos también contienen microorganismos. Se diferencian de los fertilizantes debido a que no aportan nutrientes de manera directa sino que promueven la adquisición de los mismos por las plantas y aumentan la eficiencia en la asimilación así como la tolerancia al estrés biótico y abiótico.

Además, pueden llevar a cabo diversas funciones como impulsar el crecimiento y desarrollo de las plantas durante todo su ciclo vital, aumentar la fertilidad del suelo promoviendo el crecimiento de los microorganismos que habitan el mismo, y mejorar la calidad y producción de los cultivos (Corsi et al., 2022).

El manejo agrícola sostenible implica el uso de los recursos agrícolas de manera tal que satisfagan las necesidades humanas, y que a su vez, mantengan la calidad del ambiente y la conservación de los recursos naturales a futuro. Una agricultura sostenible requiere la optimización de las prácticas de manejo del suelo así como de sus propiedades fisicoquímicas. Para lograr lo anteriormente mencionado, los procesos biológicos que se dan a nivel del suelo y la fertilidad del mismo, son imprescindibles. Mantener la diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas, es esencial para lograr el propósito de la agricultura sostenible (Giri et al., 2005).

En este trabajo se evaluó el uso de un estimulante biológico comercial importado (Foliar Blend). El mismo contiene carbohidratos, aminoácidos, micronutrientes quelatados (Mg, Mn, Zn, Co, S, Mo) y ácido salicílico. Puede ser aplicado en combinación con pesticidas, herbicidas, fungicidas y fertilizantes, ya sea en suelo, riego o foliar. Estimula la actividad biológica del suelo, mejorando el ciclo de nutrientes, favoreciendo a los microorganismos benéficos y reduciendo a los patógenos. Por otra parte, mejora la estructura del mismo, además de la disponibilidad y balance entre macro y micronutrientes. Finalmente, potencia la mineralización de nutrientes, disminuye los niveles de sodio en el suelo y permite un mayor crecimiento de la planta, desarrollo radicular, salud y mayor rendimiento de los cultivos (FoliarBlend – Agrigro)

La evaluación en nuestro país del uso de este producto como activador biológico busca estudiar su efecto sobre la calidad del suelo y sobre el crecimiento y sanidad de los cultivos. Para ello es fundamental analizar su efecto sobre la presencia y actividad de los microorganismos del suelo.

Objetivos

1) General

Evaluar los cambios de la comunidad microbiana del suelo tratado con un activador biológico comercial de uso agrícola, junto con la reducción de agroquímicos.

2) Específicos

1. Determinar el efecto del activador biológico y la reducción de agroquímicos sobre la abundancia microbiana.
2. Determinar el efecto del activador biológico y la reducción de agroquímicos sobre la actividad microbiana.

Hipótesis

La aplicación de un activador biológico, junto con la reducción de agroquímicos, en cultivos de soja y cítricos modifica la comunidad microbiana, alterando tanto su abundancia como su actividad.

Materiales y métodos

1. Sitios de muestreo

Los muestreos de suelo se realizaron en ensayos instalados específicamente para este estudio, en plantaciones de cítricos y de soja. Para llevar a cabo el ensayo de cítricos, se eligió una plantación de naranjas de variedad Valencia en el establecimiento El Repecho, ubicado en Pueblo Gallinal, Paysandú (Figura 2). El tipo de suelo en este sitio de estudio se clasifica como franco arenoso (Tabla 1). A su vez, para realizar los ensayos de soja se seleccionaron dos sitios: uno de ellos ubicado en Estación El Timbó-Paysandú (coordenadas 32°29'27.24"S 57°53'11.96"O) (Figura 4) y el otro en el Establecimiento Tres Aguas-Río Negro (coordenadas 32°31'43.23"S 58°09'16.34"O). El tipo de suelo en estos sitios se clasifica como franco arcilloso (Tabla 1). Las principales características de los suelos, el porcentaje de contenido de carbono orgánico y de materia orgánica del suelo, así como sus propiedades fisicoquímicas, se describen en la Tabla 1. Estas propiedades fueron determinadas previamente a la aplicación del activador biológico (Foliar Blend).

En cada ensayo se definieron parcelas para 2 tratamientos con 3 réplicas cada uno. Uno de los tratamientos consistió en la aplicación convencional de insumos químicos y el otro en la disminución de los mismos y en la aplicación del activador biológico (Foliar Blend).

Tabla 1: Principales características de los suelos muestreados. Se presentan las propiedades fisicoquímicas: pH en agua (H₂O), contenido de nitrógeno total (% N), contenido de carbono orgánico (% C.Org), contenido de materia orgánica (% MO), disponibilidad de fósforo (Bray I, µg P/g) y capacidad de intercambio catiónico (CIC) a pH 7 (meq/100g); así como también la textura del suelo (porcentaje de arcilla, limo y arena).

SITIO	TEXTURA	ARCILLA (%)	LIMO (%)	ARENA (%)	C Org (%)	MO (%)	CIC (meq/100g)	N (%)	pH (H ₂ O)	P
El Repecho	Franco arenoso	18,2	3,6	78,2	1,72	2,72	15,25	0,13	5,77	13,42
Timbó	Franco-arcilloso	39,7	38,8	21,5	2,89	4,39	25,43	0,22	5,87	16,26
Tres Aguas	Franco-arcilloso	35	32	33	1,28	2,2	19,33	0,22	5,7	25,42

1.1 El Repecho

Se instaló un ensayo en la plantación de naranjas variedad Valencia en El Repecho (Figura 3), en donde se realizaron seis aplicaciones del activador biológico, de 1 litro por hectárea cada una, comenzando en setiembre y finalizando en febrero.

En paralelo, al otro lado de un camino interno, se ubicó el testigo al que se le aplicaron fertilizantes por riego y vía aérea durante 8 meses (una intervención por mes empezando en setiembre). Se utilizó sulfato de cobre, oxiclورو de cobre y los siguientes fungicidas: Captan, Azoxistrobin y Difenconazol (Figura 2).

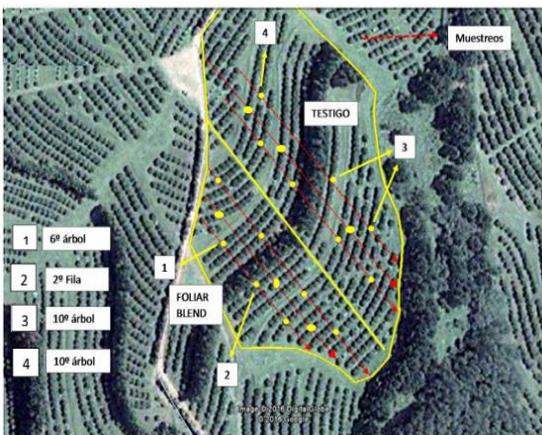


Figura 2: Imagen satelital del área de muestreo de cítricos El Repecho. La imagen muestra la plantación de naranjas, con las transectas de árboles indicadas para la recolección de muestras. Se identifica la parcela testigo y la parcela tratada con el activador biológico (Foliar Blend). Las transectas están señaladas para facilitar la ubicación exacta de las muestras en el campo.



Figura 3: Vista de un árbol de naranjas en la plantación donde se tomaron las muestras de suelo. La imagen ilustra el procedimiento para la recolección de muestras, que se realizaron a una distancia de 1 metro del tronco y a una profundidad de 0-20 cm. Se tomaron cuatro muestras compuestas alrededor de cada árbol.

1.2 Estación El Timbó y Tres Aguas

Ambos ensayos se llevaron a cabo en grandes parcelas, sobre un rastrojo de sorgo, en donde se sembró soja de primera. Se aplicó el activador biológico en tres ocasiones: 1) en el momento de realizar el tratamiento para barbecho, 2) a los 30 días del nacimiento (en conjunto con otros tratamientos como ser aplicación de herbicidas y/o insecticidas) y 3) al momento de la floración. La dosis fue de 1,2 litros por hectárea.

Se dispuso un diseño en parcelas rectangulares de entre 1 y 1,5 hectáreas, cada una con 3 repeticiones por tratamiento (Figura 4). Se intercaló el tratamiento con Foliar Blend (FB) con un testigo (Te) al cual se le aplicó: fertilizante 7-40-0-5 100 Kg por hectárea, adicionado con 100 Kg de cloruro de potasio (KCl). Para el barbecho se utilizaron 3 litros de glifosato por hectárea, al 48%, más un herbicida pre-emergente para controlar hoja ancha; post-emergencia, se emplearon 2 litros de glifosato por hectárea. Posteriormente, se realizaron intervenciones con insecticidas y fungicidas. El tratamiento con el activador biológico llevó los mismos productos pero a una dosis reducida al 30%, y no se aplicó fungicida.

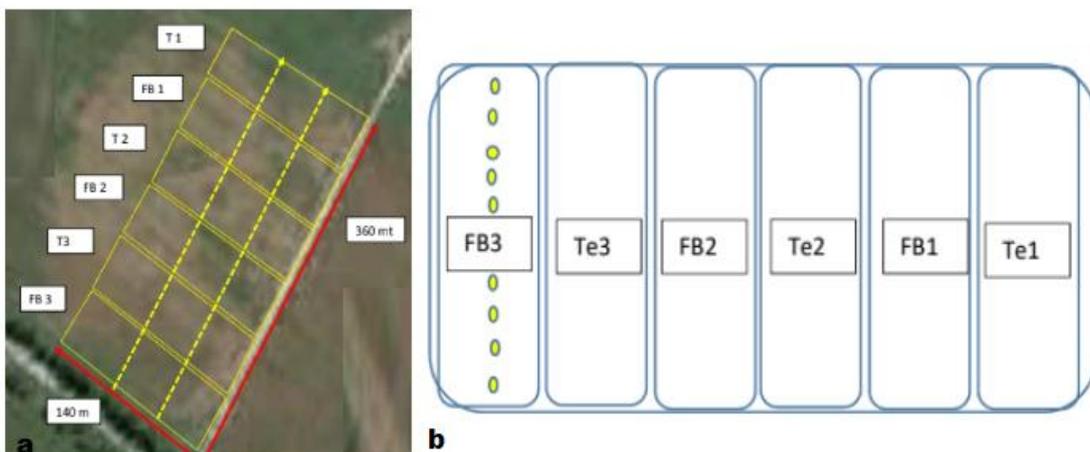


Figura 4: a) En la imagen se muestra el esquema del diseño de las parcelas, ilustrando la distribución de los tratamientos (FB) y testigos (Te) en el área de estudio. b) Diseño experimental en parcelas de entre 1 y 1,5 hectáreas cada una, dispuestas en forma de rectángulo. El diseño incluye la alternancia de parcelas tratadas con Foliar Blend (FB) y parcelas testigo (Te), por triplicado.

2. Obtención de muestras de suelo

Se tomaron muestras de suelo antes de la aplicación del activador biológico (muestreo línea de base) y luego de seis meses de haberse aplicado los tratamientos. Se realizaron muestras compuestas de la superficie de suelo (0-20 cm) con calador, combinando diez tomas de suelo de cada parcela, en el caso del ensayo en soja (Tres Aguas y Timbó). En el caso de los suelos de cítricos (El Repecho), se tomaron cuatro muestras por árbol a 1m del tronco, que se combinaron con las de 3 a 4 árboles de cada transectas. Todas las muestras fueron conservadas a 4° C hasta el momento de su análisis. Posteriormente fueron tamizadas para su homogeneización, previo secado a 20°C en caso de ser necesario.

3. Determinación de la humedad

El porcentaje de humedad de cada muestra se determinó secando 10 g de suelo en estufa a 100°C durante 48 h, con el fin de expresar los resultados de los análisis microbiológicos en función de gramos de suelo seco (UFC/g de suelo seco) (Frioni, 2006). A partir de los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de humedad (H%) y el factor de corrección de la humedad (h).

Se calculó el porcentaje de humedad (H%) y el factor de corrección de la humedad (h), a partir de la siguiente fórmula:

$$H\%: \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco} \times 100}{\text{Peso seco}} \qquad h: \frac{100 + H\%}{100}$$

4. Análisis microbiológicos

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

A partir de muestras conservadas a 4°C por un máximo de dos meses, se determinó el número de bacterias viables pertenecientes a diferentes grupos. Para ello, se suspendieron 5 g de suelo en 45 ml de solución estéril de pirofosfato de sodio al 0,1% (p/v) y se agitó a 150 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, a partir de 1ml de la

suspensión de suelo, se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar una dilución final de 10^{-6} .

Para el recuento de heterótrofos aerobios se emplearon las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , plaqueando 10 μ L en gota, por triplicado. Para Actinomycetota se utilizaron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , plaqueando en superficie 100 μ L, por duplicado. Asimismo, para el recuento de *Pseudomonas* fluorescentes, hongos filamentosos o levaduras y *Bacillus* spp se usaron las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , plaqueando 100 μ L, por duplicado.

El recuento de bacterias amonificantes se llevó a cabo mediante la técnica del NMP; se sembraron 100 μ L por tubo en 5ml de medio y por triplicado de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . Para realizar los recuentos antes mencionados se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- Heterótrofos aerobios: medio Tryptic Soy Agar 1/10 Difco ® (TSA 1/10) suplementado con cicloheximida 100 μ g/ml (Smit et al., 2001) (Anexo)
- Actinomycetota: medio Starch Casein Agar (SCA) suplementado con cicloheximida 100 μ g/ml (Leoni y Ghini, 2003) (Anexo).
- *Pseudomonas* fluorescentes: medio King's B (KB) (King et al., 1954) suplementado con ampicilina 50 μ g/ml, cloranfenicol 12,5 μ g/ml y cicloheximida 100 μ g/ml (Geels y Schippers, 1983).
- Hongos filamentosos y levaduras: medio agar malta (AM) al 2% suplementado con cloranfenicol 100 μ g/ml y ajustando el pH a 4,5 con ácido láctico (Bettucci y Roquebert, 1995).
- *Bacillus* spp. (esporulados aerobios): medio Tryptic Soy Agar 1/10 Difco® (TSA 1/10) suplementado con cicloheximida 100 μ g/ml (Smit et al., 2001) luego de incubar las diluciones de suelo a 85°C por 30 min para eliminar las células vegetativas.
- Amonificantes: medio líquido con peptona al 4% (Seeley et al., 1991).

Las placas y los tubos se incubaron a 25°C; las placas se colocaron en estufa mientras que los tubos se colocaron en shaker a 150 rpm. A las 48 h se determinó el número total de hongos filamentosos o levaduras, de *Bacillus* spp. y de colonias típicas de *Pseudomonas* fluorescentes, mediante la detección del pigmento fluorescente en luz UV. Además, se revelaron los tubos para la detección de bacterias amonificantes mediante un revelado colorimétrico, empleando el reactivo de Nessler. Para ello se colocó una gota de

cultivo y una gota de reactivo: si la reacción revela un color naranja a rojizo (indicando la presencia de amonio), se sugiere la presencia de bacterias amonificantes. En cambio, el color amarillo (ausencia de amonio) indica la ausencia de las mismas (Figura 7). Los datos se interpretaron utilizando las tablas del NMP. Finalmente, en este caso, el resultado se calculó multiplicando el valor de las tablas por el inverso de la dilución sembrada en la serie del medio, ya que se usó 1ml para inocular los tubos. (Seeley et al., 1991) (Anexo).

A los 7 días se determinó el número de colonias totales de heterótrofos, y de colonias típicas de Actinomycetota.

5. Medida de actividad microbiana por respiración y cálculo

Se midió la actividad microbiana por respiración, determinando la concentración de CO₂ mediante la técnica de retrotitulación. La medida se llevó a cabo previo a la aplicación del activador biológico, y seis meses después de la aplicación del mismo.

En frascos herméticamente cerrados, se incubaron 50 g de suelo a 25°C, durante 48 h. Previamente se realizó el ajuste de la humedad al 75% de la capacidad de campo:

$$\frac{m \text{ AGUA AGREGAR} = m \text{ MUESTRA HÚMEDA} \times (0,75 \times \text{CC} + \text{H}\%)}{(1 + \text{\%H})}$$

CC: Capacidad de campo

H%: Porcentaje de humedad

En cada recipiente hermético se colocó, además del suelo, un vaso de bohemia conteniendo 5 ml de NaOH 0,25 N. A su vez, en dos recipientes herméticamente cerrados, se dispusieron solamente los vasos de bohemia con NaOH, que fueron utilizados como el blanco de la reacción. La concentración de CO₂ producido por la respiración se determinó por retrotitulación. Luego de 48 h, se extrajo el NaOH, se le agregaron 5 gotas de fenolftaleína y se tituló con HCl 0,1 N. Cuando la solución vira de rosado a transparente, se halla el punto final de la titulación. El gasto de HCl refleja la cantidad de NaOH que no reaccionó con el CO₂ (el CO₂ liberado por estos microorganismos reacciona con el NaOH), reduciendo su concentración. Para corregir la interferencia del CO₂ del aire, se descontó el gasto de HCl de los blancos, del gasto de HCl en los frascos con suelo.

Para el cálculo, se consideró la diferencia entre el gasto de HCl del blanco de la reacción y los ml de HCl gastado en la titulación. Los miliequivalentes de ácido se calcularon de la siguiente manera:

$Mq = \Delta V * N \text{ ácido} * 1000$, donde ΔV es la diferencia en el volumen de la solución titulante menos el volumen utilizado en el blanco en litros; N es la normalidad del ácido y 1000 es el factor de conversión de equivalente a miliequivalente. Luego se calcularon los miligramos de carbono, a partir de la siguiente fórmula:

$mgC = \text{Miliequivalentes de ácido} * 6$ donde 6 es el peso equivalente del carbono. Posteriormente, empleando las siguientes fórmulas, se calculó:

$$mgC/Kg \text{ de suelo} = \frac{mgC * 1000}{\text{peso de suelo}} \quad Y \quad mg \text{ C}/Kg \text{ suelo seco} = mgC/Kg \text{ de suelo} * h.$$

Donde h es el factor de corrección de la humedad. Finalmente, se calculó mgC/Kg de suelo seco a partir de la siguiente fórmula:

$$mg \text{ C} - CO_2/Kg \text{ suelo seco} = mgC/Kg \text{ de suelo seco} * \frac{\text{masa atómica del C}}{\text{masa atómica del CO}_2}$$

(Anderson, 1985; Gómez, 2018).

6. Análisis de datos

Los datos obtenidos a partir de los recuentos en placa, de los ensayos de NMP y de los ensayos de respiración se convirtieron, según el porcentaje de humedad de cada muestra, con el fin de expresarlos como unidades formadoras de colonias (UFC)/ g suelo seco, como NMP/ g de suelo seco y como mg C-CO₂/kg de suelo seco, según las siguientes fórmulas:

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

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

Los valores de recuentos y NMP fueron transformados a log 10. Se examinó la normalidad de los datos (tanto de abundancia como de respiración) utilizando el test Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianza aplicando el test de Bartlett. Cuando la distribución fue normal, y las varianzas homogéneas, se evaluó para cada variable (abundancia de los grupos microbianos y actividad microbiana) las diferencias entre los tratamientos mediante el test paramétrico ANOVA de una vía (con tratamiento como factor). En el caso contrario, se realizó el análisis no paramétrico, utilizando el test de varianza de Kruskal-Wallis. Se utilizó el programa RStudio para realizar todos los test.

Resultados

1. Abundancia microbiana en suelo

Se analizaron las poblaciones cultivables de heterótrofos aerobios, Actinomycetota, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp., hongos y levaduras, empleándose la técnica de recuento en placas (Figura 5).

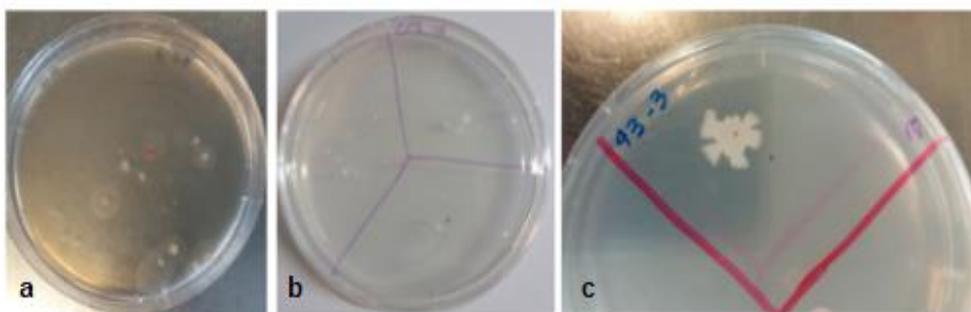


Figura 5: Visualización de los cultivos microbianos. a) Placa con Actinomycetota b) y c) placas con bacterias heterótrofas.

La abundancia de bacterias amonificantes se evaluó mediante la técnica del número más probable (NMP) (Figura 6).

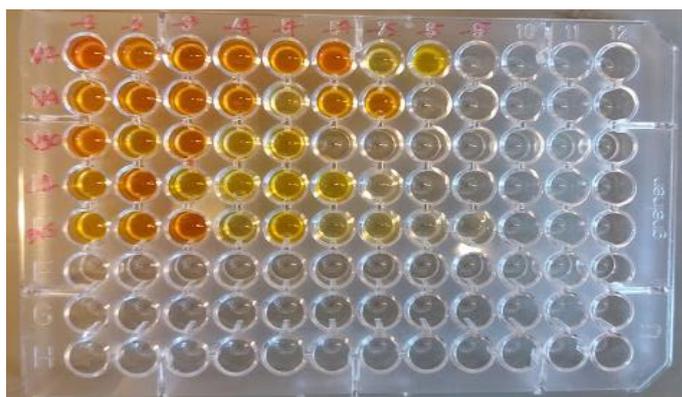


Figura 6: Prueba con reactivo de Nessler para la detección de bacterias amonificantes. Se visualizan pruebas positivas (color naranja-rojizo) y pruebas negativas (color amarillo).

Los recuentos se llevaron a cabo en muestras provenientes de tres ensayos: dos de ellos instalados en suelos de soja (Timbó y Tres Aguas) y el tercero instalado en una plantación de naranjas (El Repecho). Los muestreos de la línea de base mostraron que el número de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco, para

cada uno de los siguientes grupos en todos los sitios, se mantuvo dentro del mismo rango (Figura 7); para los heterótrofos 10^7 UFC/g suelo seco, para Actinomycetota 10^6 UFC/g suelo seco, para los hongos entre 10^4 y 10^5 UFC/g suelo seco y para las bacterias amonificantes 10^6 y 10^7 UFC/g suelo seco. Para las levaduras, en cultivos de soja (sitio Tres Aguas) no se registró ningún valor, mientras que para los suelos de cítricos (El Repecho) y soja (Timbó), los valores hallados se encontraron entre 10^4 y 10^6 UFC/g suelo seco. Para la línea de base, no se realizaron análisis de *Pseudomonas* fluorescentes ni para *Bacillus* spp.

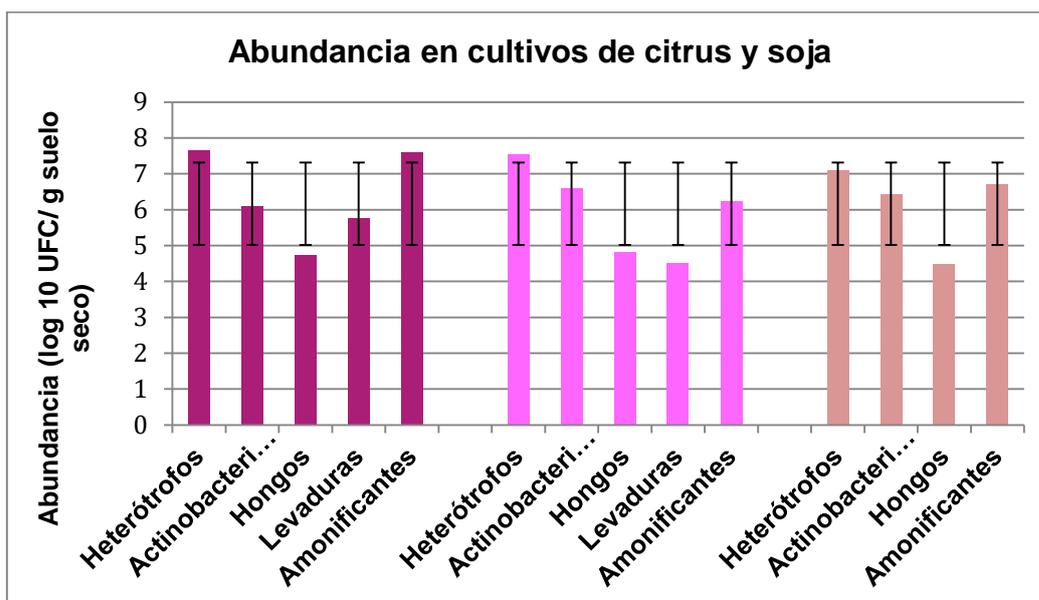


Figura 7: Línea de base de la abundancia de microorganismos expresados en UFC/g suelo seco, en cultivos de cítricos y soja antes del tratamiento con el activador biológico (Foliar Blend). En color violeta citrus (sitio El Repecho); en color lila soja (sitio Timbó); en color rosado soja (sitio Tres Aguas).

Los recuentos de microorganismos, realizados para cada grupo en los tres ensayos, luego de 6 meses de la aplicación del activador, se mantuvieron consistentemente dentro del mismo rango, mostrando valores similares de 10^6 - 10^7 UFC/g suelo seco para heterótrofos, tanto en el testigo como con el activador (Figuras 8 y 9). No se constataron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los sitios de muestreo.

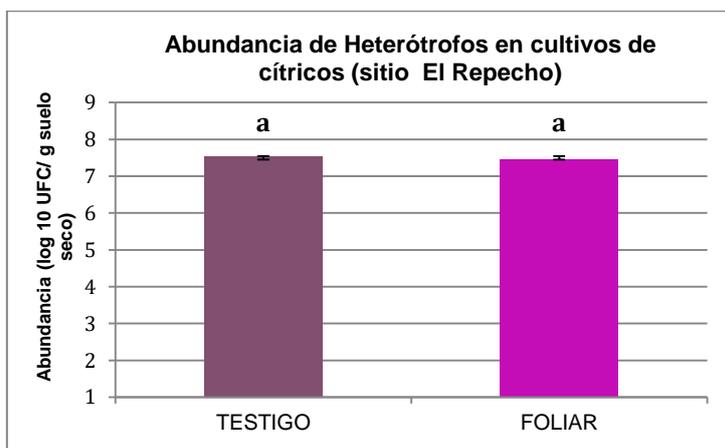


Figura 8: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de heterótrofos en cultivos de cítricos, sitio El Repecho, expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio: testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

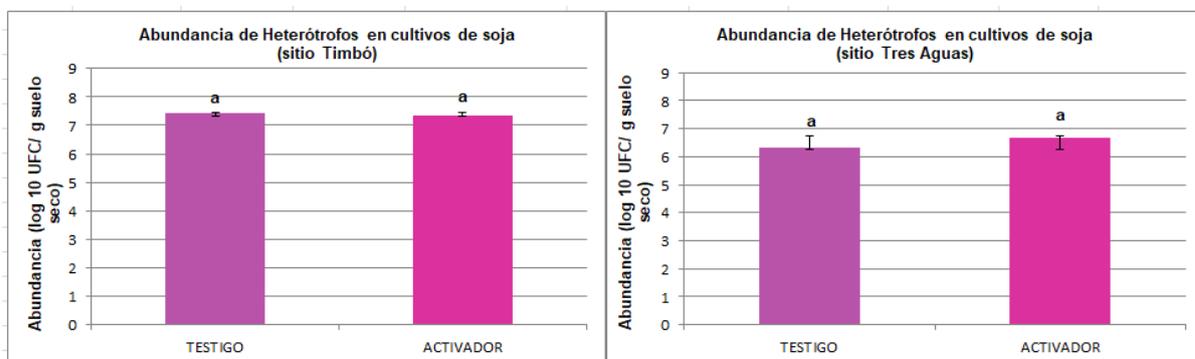


Figura 9: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de heterótrofos en cultivos de soja, sitios: Timbó (izquierda) y Tres Aguas (derecha), expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio: testigo sin activador biológico y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas para los tratamientos.

Actinomycetota mostró valores de 10^6 UFC/g suelo seco en todos los ensayos con y sin activador (Figuras 10 y 11). Únicamente se observó un aumento significativo en la población de Actinomycetota en cultivos de soja (Tres Aguas), donde el recuento en la parcela testigo fue de 3.48×10^6 UFC/g de suelo seco respecto al ensayo con activador que mostró un recuento de 4.66×10^6 UFC/g de suelo seco.

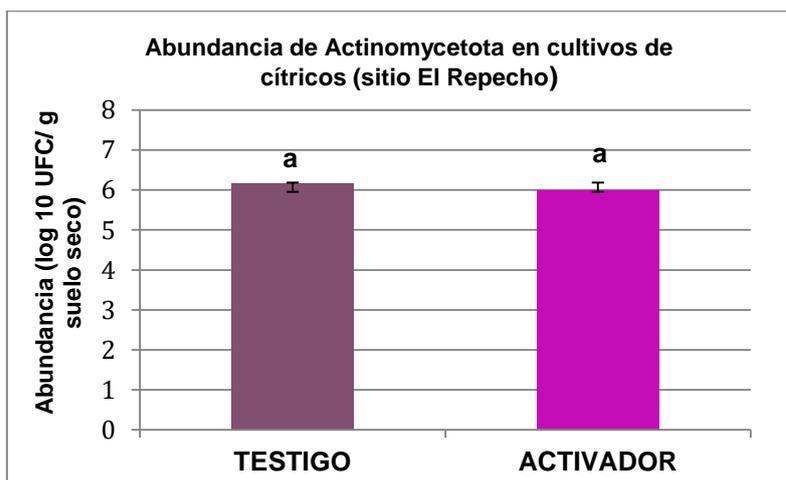


Figura 10: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de Actinomycetota en cultivos de cítricos, sitio El Repecho, expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio: testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

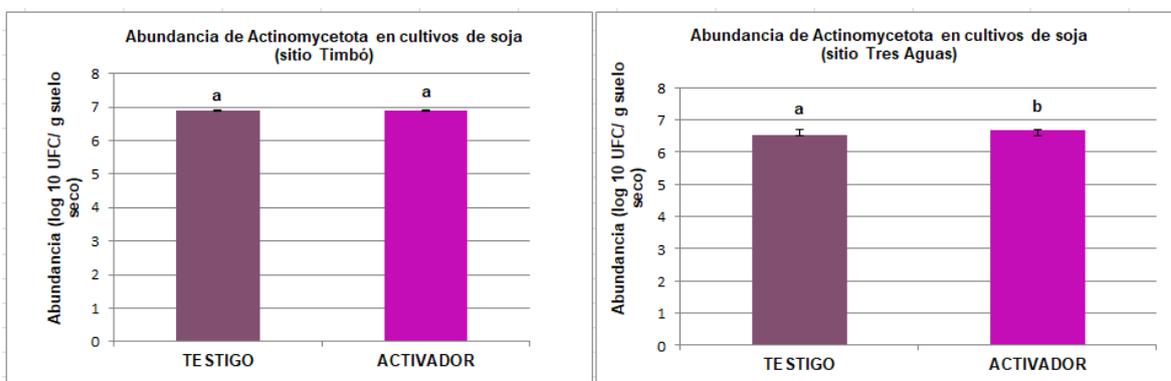


Figura 11: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de Actinomycetota en cultivos de soja, sitios: Timbó (izquierda) y Tres Aguas (derecha) expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio: testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

Los recuentos de hongos filamentosos en los tres ensayos, tanto con activador como sin él, oscilaron entre 10^4 - 10^5 UFC/g de suelo seco (Figuras 12 y 13). Por otra parte, en soja (Timbó) se observó una disminución en la abundancia del testigo frente al activador, siendo 4.63×10^4 UFC/g de suelo seco en el testigo y 3.76×10^4 UFC/g de suelo seco con el activador.

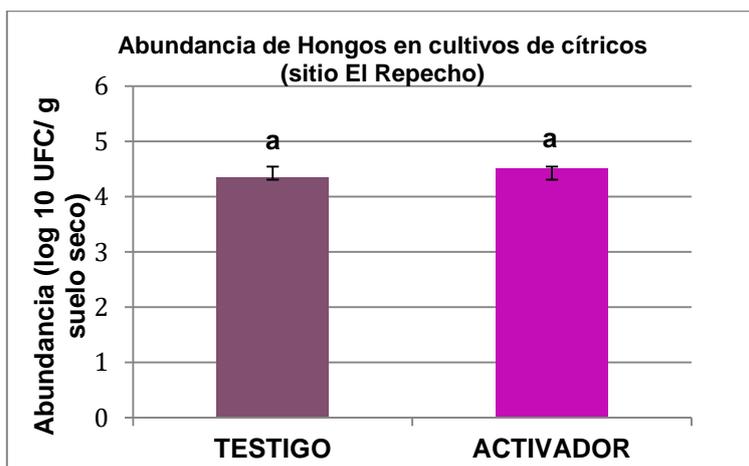


Figura 12: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de hongos filamentosos en cultivos de cítricos, sitio El Repecho, expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio, testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

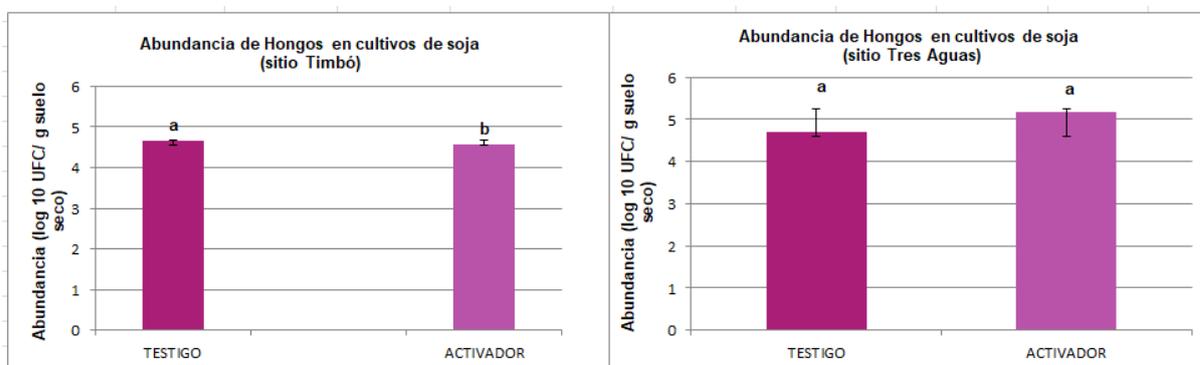


Figura 13: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de hongos filamentosos en cultivos de soja, sitios: Timbó (izquierda) y Tres Aguas (derecha), expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio, testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

Para *Bacillus* spp, los valores se ubicaron entre 10^5 - 10^6 UFC/g de suelo seco (Figuras 14 y 15). En soja (Timbó), se observaron diferencias significativas en su abundancia. Se apreció un aumento en la abundancia cuando se aplicó el activador, con un promedio de 3.44×10^6 UFC/g de suelo seco en el testigo frente a 3.48×10^6 UFC/g en el activador.

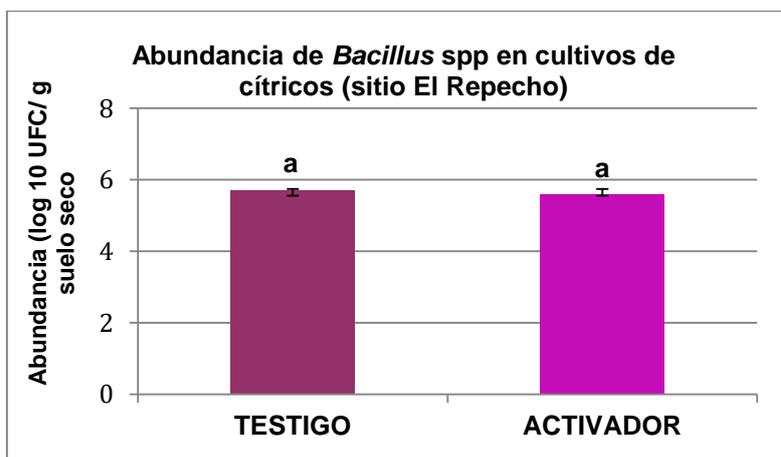


Figura 14: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de *Bacillus* spp en cultivos de cítricos sitio El Repecho, expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio: testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

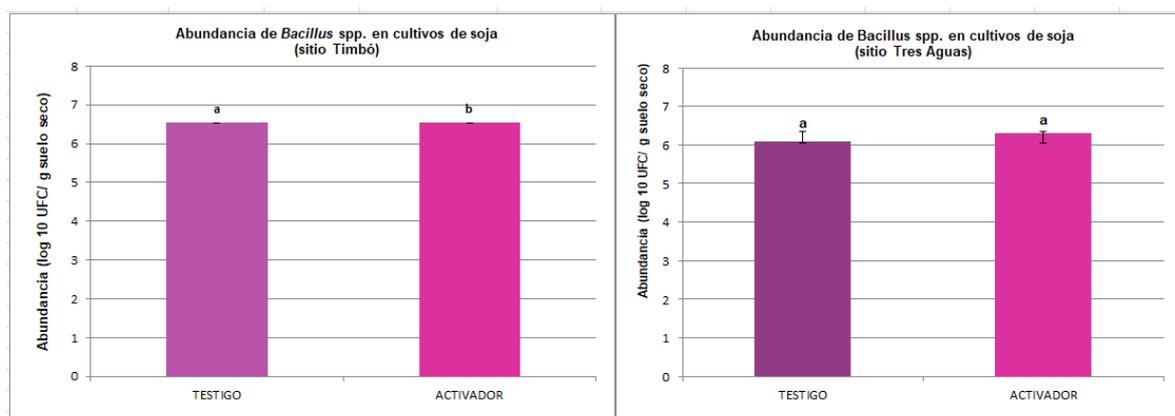


Figura 15: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de *Bacillus* spp en cultivos de soja sitio: Timbó (izquierda) y Tres Aguas (derecha), expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio: testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

Para las *Pseudomonas* fluorescentes, se hallaron valores entre 10^3 - 10^4 UFC/g suelo seco, en todos los casos. Se encontraron diferencias significativas en cítricos sitio El Repecho, observándose una disminución de dichas poblaciones en suelos que fueron tratados con el activador (1.58×10^4 UFC/g suelo seco) frente al testigo (5.62×10^4 UFC/g suelo seco). En soja sitio Tres Aguas, se observó un aumento

significativo de la abundancia respecto al testigo, de 6.22×10^3 a 7.09×10^4 UFC/g suelo seco (Figuras 16 y 17) (Anexo, Tabla 3). Se apreció a su vez, un aumento no significativo de las mismas en soja sitio Timbó, reportando valores medios de 4.61×10^3 UFC/g suelo seco a 7.42×10^4 UFC/g suelo seco, respecto al testigo.

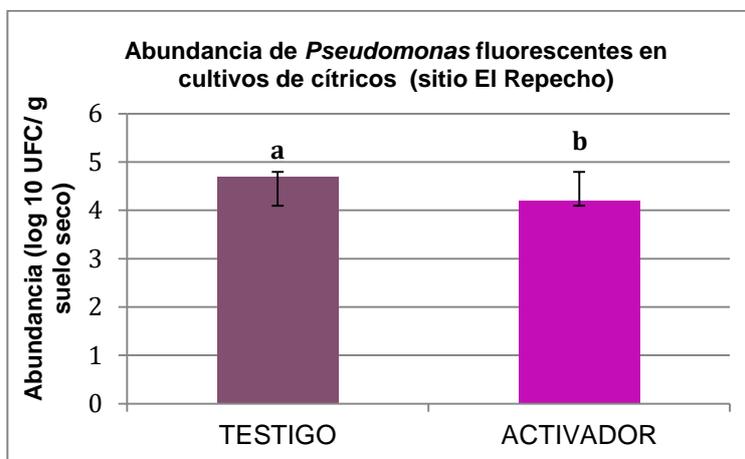


Figura 16: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes en cultivos de cítricos, sitio El Repecho, expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio: testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

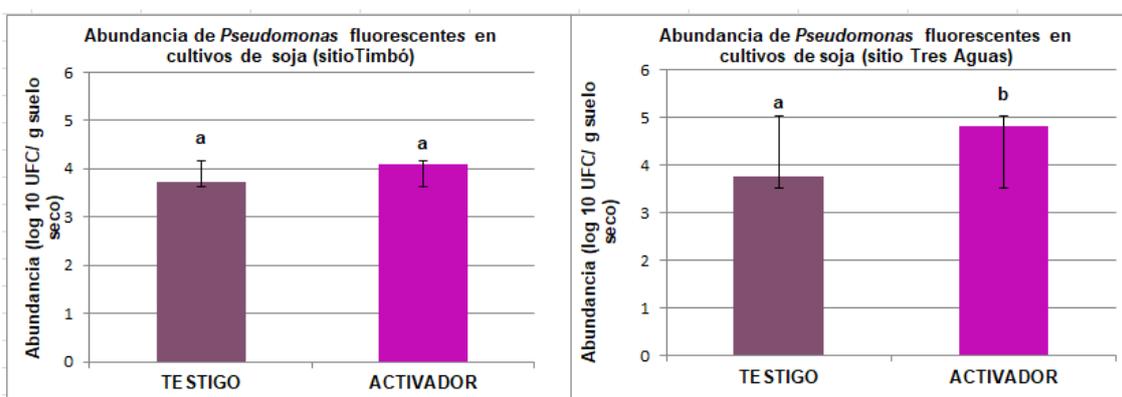


Figura 17: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes en cultivos de soja, sitios: Timbó (izquierda) y Tres Aguas (derecha), expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio: testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

Las bacterias amonificantes mostraron valores entre 10^6 - 10^7 UFC/g suelo seco. En los suelos de cítricos (El Repecho) se verificaron diferencias significativas, observándose una disminución de la abundancia en el tratamiento con activador, con valores de 1.23×10^7 UFC/g suelo seco en la parcela testigo y 3.55×10^6 UFC/g suelo seco con activador (Figuras 18 y 19) (Anexo. Tabla 3). Aunque en soja sitio Timbó los gráficos muestran una tendencia de disminución en la abundancia de estas bacterias de 9.92×10^6 a 2.16×10^6 UFC/g suelo seco en el tratamiento con el activador en comparación con el testigo las diferencias no alcanzaron significancia estadística (Anexo Tabla 3).

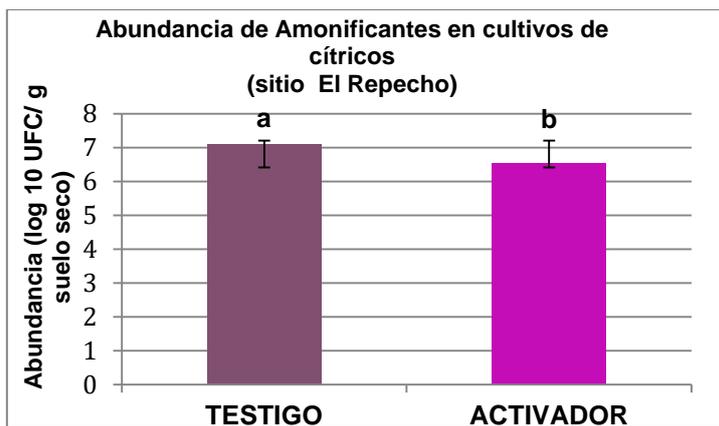


Figura 18: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de bacterias amonificantes en cultivos de citrus, sitio El Repecho, expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio, testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

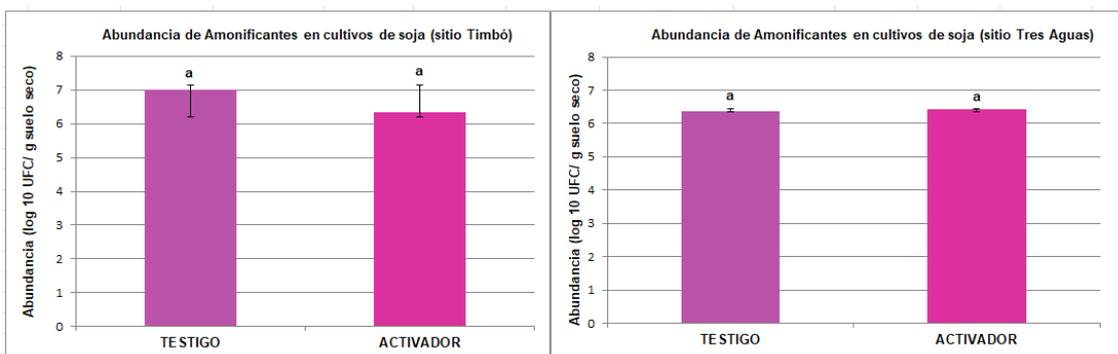


Figura 19: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de bacterias amonificantes en cultivos de soja sitios: Timbó (izquierda) y Tres Aguas (derecha), expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio, testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

Finalmente, no se cuantificaron levaduras en cítricos (El Repecho). En los cultivos de soja (Timbó y Tres aguas) se hallaron en el rango de 10⁴ UFC/g suelo seco, y no se identificaron diferencias significativas, en ninguno de los sitios (Figura 20).

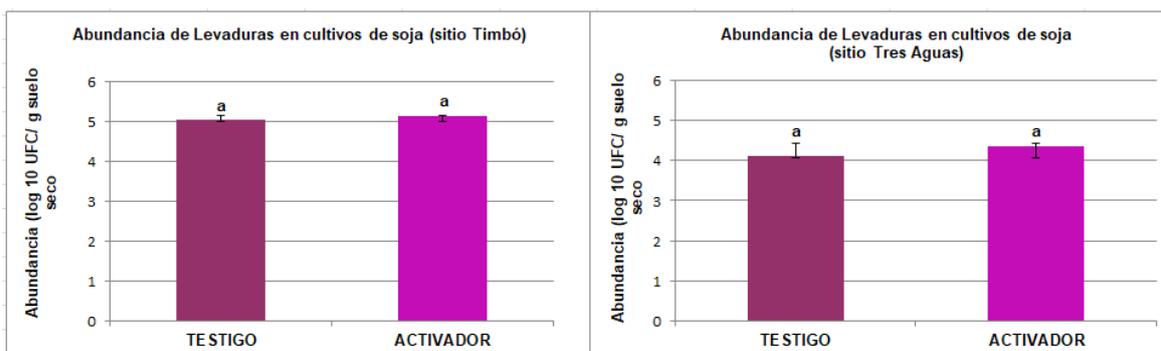


Figura 20: Valores medios de tres repeticiones de abundancia de levaduras en cultivos de soja, sitios: Timbó (izquierda) y Tres Aguas (derecha), expresados en logaritmo de UFC/g suelo seco, las barras de error representan la desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas en tratamientos del mismo sitio, testigo sin activador, y activador biológico (Foliar Blend), a los 6 meses de aplicación del mismo. Letras diferentes, significan diferencias significativas entre los tratamientos.

2. Respiración microbiana en suelo

Se midió la actividad microbiana por respiración, determinando la concentración de CO₂ mediante la técnica de retrotitulación. En las medidas realizadas en la línea de base, soja sitio Tres Aguas presentó el valor más alto de actividad microbiana, con un valor medio de 8,74 mg C-CO₂/Kg suelo seco, en comparación con los valores medios de soja sitio Timbó 2,83 mg C-CO₂/Kg suelo seco y de cítricos sitio El Repecho de 2,38 mg C-CO₂/Kg suelo seco, valor mínimo registrado (Figura 21).

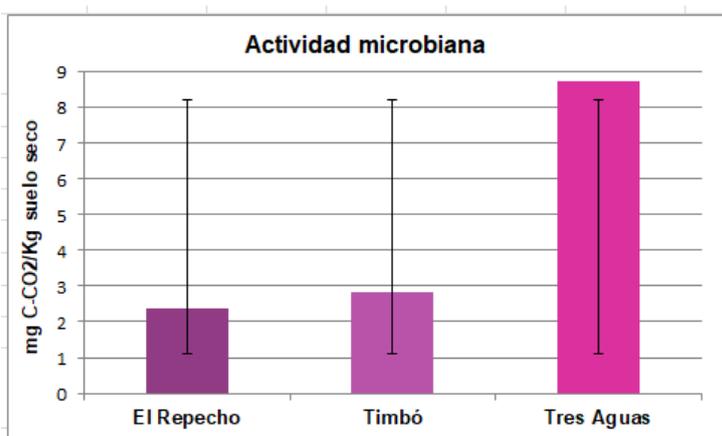


Figura 21: Línea de base de la respiración, medida en mg C-CO₂/Kg suelo seco, en suelos antes del tratamiento con el activador biológico (Foliar Blend) en El Repecho, Timbó y Tres Aguas.

En el gráfico de soja (Timbó) (Figura 23) se aprecia una tendencia al aumento en el activador respecto al testigo sin significancia estadística, pero con gran variabilidad entre las réplicas (Figura 23).

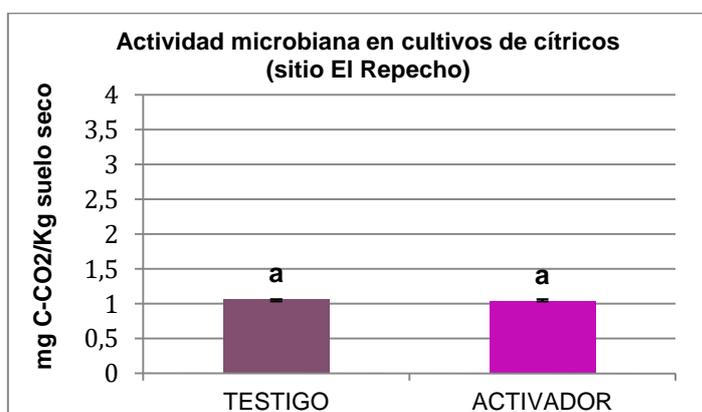


Figura 22: Respiración a 6 meses de la aplicación del activador biológico (Foliar Blend) en El Repecho (citrus).

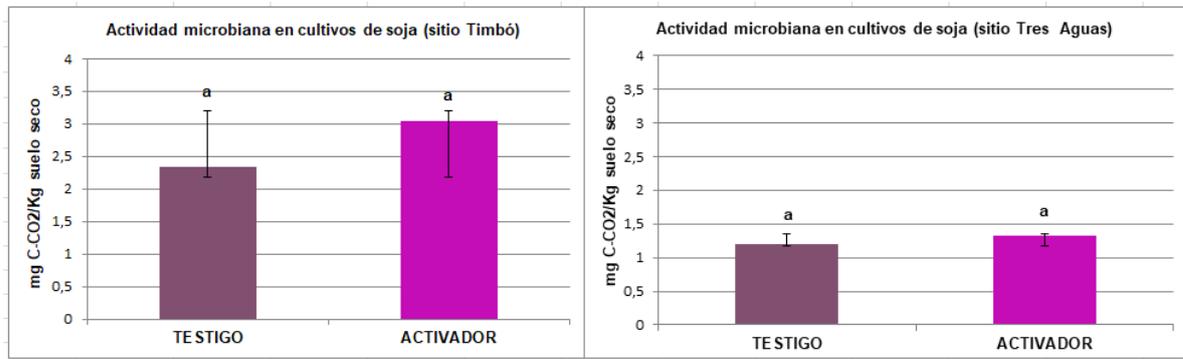


Figura 23: Respiración y a 6 meses de la aplicación del activador biológico (Foliar Blend) en suelos de soja: Tres Aguas (derecha) y Timbó (izquierda).

Discusión

Para mantener la productividad agrícola y el uso eficiente de los recursos, orientándose hacia el manejo sustentable de las prácticas agrícolas, es crucial preservar y, en algunos casos, mejorar la capacidad de los suelos para proporcionar servicios ecosistémicos adecuados, proceso que depende en gran medida de la actividad de los microorganismos del suelo. Estudiar la abundancia y la actividad de estos microorganismos es de gran relevancia para comprender el impacto de los fertilizantes y los estimuladores biológicos (Dixon y Tilston, 2010). En este trabajo, se apuntó a evaluar el impacto de un activador biológico comercial importado a nivel de la abundancia y actividad microbiana en suelos de cultivo de soja y cítricos.

Hasta el momento no se han realizado estudios que reporten el efecto de la aplicación de este activador biológico en suelos de Uruguay, así como tampoco estudios de abundancia y actividad microbiana en otras partes del mundo. Sin embargo, existen estudios que revelan datos debido a la aplicación del mismo, que apuntan a evaluar el crecimiento, rendimiento y biomasa de diferentes cultivos; de las propiedades de las semillas, raíces, hojas y granos.

Para evaluar los efectos del activador biológico, se emplearon técnicas microbiológicas clásicas como el recuento en placa y el método del número más probable (NMP). El recuento en placa, a pesar de sus limitaciones, sigue siendo una herramienta tradicional para medir la abundancia de microorganismos heterótrofos activos (Kirk et al., 2004). El método del NMP, por otro lado, es una técnica semi-cuantitativa que detecta microorganismos en bajas concentraciones mediante la identificación de compuestos producidos durante su crecimiento o turbidez (Zitz et al., 2011). Ambos métodos ofrecen una visión complementaria del impacto del activador en las poblaciones microbianas. Para la actividad microbiana se utilizó la técnica de retrotitulación, que mide indirectamente el CO₂ respirado, reflejando la actividad metabólica de los microorganismos (Dixon y Tilston, 2010).

1. Abundancia de microorganismos cultivables

En este trabajo se determinó la abundancia de las siguientes comunidades microbianas: bacterias heterótrofas aerobias, *Pseudomonas fluorescentes*, *Bacillus* spp, bacterias amonificantes, hongos filamentosos y levaduras. El valor medio de abundancia de las bacterias heterótrofas se halló en el orden de 10^6 - 10^7 UFC/ g suelo seco. Para las bacterias heterótrofas en suelos de pradera de Uruguay se reportaron valores similares (Bajsa, 2008) y en suelos de producción de caña de azúcar también (Wajswol, 2018). En todos los trabajos anteriores las poblaciones de bacterias cultivables se determinaron por recuento en placas con medio TSA 1/10. En este trabajo se reportan valores medios de entre 10^4 y 10^5 UFC/g de suelo seco para hongos filamentosos, mientras que en otros estudios realizados en Uruguay que utilizaron técnicas similares y rosa de bengala como medio de cultivo, reportan una abundancia que se encuentra en el orden de 10^4 UFC/g de suelo seco (Silva, 2024). La abundancia de Actinomycetota en este estudio se encontró en valores de 10^6 UFC/g de suelo seco, mientras que en otros estudios en Uruguay se han reportado valores menores: 10^5 UFC/g de suelo seco en suelos con rotación de cultivos de sorgo, soja, trigo y maíz con una aplicación continua durante dos años de Biofertilizantes de Estiércol Tratado Aeróbicamente (BETA; Silva, 2024) y valores similares de 10^5 - 10^6 UFC/g de suelo seco en suelos destinados a cultivos de caña de azúcar, tratados con vinaza (Senatore, 2013). Es relevante mencionar que, aunque en el estudio de Senatore (2013) se utilizó el mismo medio de cultivo que en este trabajo, el otro estudio empleó el medio Agar-Glicerol-Asparagina. Además, los análisis fueron realizados en diferentes cultivos, aplicando diferentes tratamientos en ambos casos, pudiendo ser estas diferencias las que expliquen los disímiles valores de abundancias obtenidos.

Se han reportado diferentes abundancias de *Pseudomonas fluorescentes* en suelos agrícolas. En suelos de cultivo de caña de azúcar, se han encontrado valores en el rango de 10^3 a 10^4 UFC/g de suelo seco, utilizando el medio de cultivo King's B (KB). En suelos agrícolas sin laboreo en Argentina, se reportó una abundancia de 2×10^4 UFC/g de suelo seco (Agaras et al., 2012), empleando el medio de cultivo S1 (Gould et al., 1985). Por otro lado, en suelos de pradera, se ha observado una concentración de 5×10^5 UFC/g de suelo seco (Bajsa, 2008), utilizando el medio de cultivo KB. En comparación, el presente estudio reporta una abundancia de 10^3 a 10^4

UFC/g de suelo seco, utilizando el medio de cultivo KB. Por otra parte, para las levaduras, en este trabajo se reportan valores medios de 10^4 UFC/g suelo seco, utilizando el medio de cultivo agar malta (AM) al 2% suplementado con cloranfenicol, mientras que en otro estudio sobre cultivos de maíz, se reportaron valores entre 10^5 - 10^6 UFC/g suelo seco, utilizando el medio Sabouraud con cloranfenicol (Sarabia et al., 2014). La abundancia hallada para *Bacillus* spp., fue de 10^5 - 10^6 UFC/g de suelo seco, similar a la reportada por Bajsa (2008) y Wajswol (2018) de valor medio 10^6 UFC/g suelo seco, empleándose en todos los casos el mismo medio de cultivo. Finalmente, para las bacterias amonificantes, en este trabajo se reportan valores entre 10^6 - 10^7 UFC/g suelo seco, al igual que en el trabajo de Senatore (2013), donde se reportaron valores coincidentes de 10^6 - 10^7 , usando el mismo medio de cultivo.

Comparando los resultados obtenidos, por sitio de muestreo, entre la parcela testigo y la tratada con el activador biológico, se puede observar que el mismo no tiene un efecto significativo en todas las poblaciones de microorganismos por igual, bajo estas condiciones experimentales específicas. En los cultivos de cítricos (el Repecho), las comunidades microbianas que experimentaron cambios estadísticamente significativos en su abundancia fueron las *Pseudomonas* fluorescentes y las bacterias amonificantes, observándose una disminución de la abundancia respecto al testigo en ambos casos. En soja sitio Timbó se verificaron cambios significativos en las poblaciones de hongos filamentosos, con una disminución de la abundancia respecto al testigo; en el caso de las poblaciones de *Bacillus* spp. la abundancia aumentó significativamente respecto al testigo. Las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes aumentaron sin significancia estadística. Finalmente, en soja sitio Tres Aguas se observaron cambios significativos en las poblaciones de Actinomycetota y de *Pseudomonas* fluorescentes, incrementándose la abundancia en ambos casos, respecto al testigo.

Luego de estudiar la abundancia de varias poblaciones microbianas en todos los sitios, se pudo observar que las *Pseudomonas* fluorescentes mostraron la mayor diferencia entre testigo y activador, comparada con otros grupos de microorganismos. Este grupo se destaca por su rápida respuesta a cambios en el entorno del suelo y su capacidad para adaptarse y colonizar diversos tipos de

suelos, gracias a sus características genéticas y capacidades metabólicas (Álvarez-García et al., 2020; Bajsa, 2008). En los cultivos de cítricos (El Repecho), la abundancia de estas bacterias disminuye significativamente, mientras que en los cultivos de soja (Timbó y Tres Aguas) aumenta. Esta diferencia en la respuesta puede relacionarse con las distintas características del suelo de los cultivos de soja y citrus. Los suelos presentan variabilidad en su composición, como gradientes y diferencias en agregación, textura, densidad, concentración de O₂, disponibilidad de agua, contenido orgánico, disponibilidad de N y dinámica vegetal, factores que influyen en la abundancia microbiana (Kennedy, 1999). El suelo de cítricos El Repecho es franco-arenoso, mientras que los suelos de soja (Timbó y Tres Aguas) son franco-arcillosos; estos últimos, con mayor capacidad de retención de agua y nutrientes, soportan una mayor biomasa microbiana. Los suelos de textura fina (arcillosos) contienen típicamente mayor cantidad de materia orgánica y biomasa bacteriana en comparación con los suelos de textura gruesa (arenosos). Estudios de autores han demostrado que la textura fina de los suelos, promueve el crecimiento bacteriano, debido a que las partículas de arcilla protegerían la materia orgánica, conformando un refugio para las bacterias de la depredación (Meliani et al., 2012). Adaptar el uso del activador biológico al tipo de suelo es esencial para optimizar la salud y productividad del suelo

Por otro lado, el aumento en la abundancia de *Bacillus* spp. en soja sitio Timbó podría estar asociado a su notable capacidad de adaptación a una amplia variedad de hábitats, tipos de suelo y condiciones fisicoquímicas. Este género destaca por su versatilidad metabólica, lo que le permite sobrevivir y prosperar en diversos ambientes (Tejera-Hernández et al., 2011). *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* spp. actúan de manera interrelacionada; la complejidad y variedad de mecanismos empleados por ambos para promover el crecimiento vegetal y controlar enfermedades resaltan su gran relevancia y adaptabilidad en el contexto agrícola (Sivasakthi et al., 2014). Estas capacidades permiten a estas bacterias desempeñar roles cruciales en la mejora de la salud de las plantas y la sostenibilidad de los sistemas agrícolas (Sivasakthi et al., 2014). Quizás esta interrelación pueda explicar el aumento y la disminución de la abundancia de ambas poblaciones de bacterias, ya que en cítricos (sitio El repecho) ambas disminuyen (*Bacillus* spp. sin significancia estadística), en soja (sitio Timbó) ambas aumentan (*Pseudomonas* fluorescentes sin

significancia estadística) y en soja (sitio Tres Aguas) ambas aumentan (*Bacillus* spp. sin significancia estadística). La falta de significancia estadística en algunos casos puede indicar que otros factores están influyendo en la abundancia de estas bacterias, además de sus adaptabilidades genéticas y metabólicas. Como se ha mencionado con anterioridad, estos factores pueden incluir, entre otros, las propiedades y tipos del suelo, como su pH, contenido de nutrientes y estructura, que desempeñan un papel crucial en la abundancia de microorganismos en el suelo (Kuramae et al. 2011).

El análisis de las poblaciones microbianas muestra que el activador biológico podría impactar de manera variable. En los cultivos de cítricos (El Repecho), en los resultados con el activador, se reduce la abundancia de Actinomycetota (sin significancia estadística) y de bacterias amonificantes (con significancia estadística). En soja (sitio Timbó), disminuye la abundancia de ambas poblaciones (sin significancia estadística) y la de hongos filamentosos (con significancia estadística). En soja (sitio Tres Aguas), aumenta la abundancia de bacterias amonificantes y de Actinomycetota, siendo estadísticamente significativo solo para estas últimas. Esto sugiere que podrían existir otros factores además del uso del activador (como la textura y capacidad de retención de agua del suelo) que estén influyendo en las fluctuaciones observadas en la abundancia. Un estudio realizado por Kuramae et al. (2011), sugiere que las propiedades fisicoquímicas del suelo son más relevantes para las variaciones de abundancia que las prácticas de manejo de los suelos.

Esta variabilidad destaca la importancia de considerar el tipo de suelo y las características microbianas, como lo indican estudios sobre variaciones en poblaciones bacterianas (Meliani et al., 2012). No obstante, las técnicas de cultivo estándar pueden no captar pequeñas variaciones ni toda la diversidad microbiana del suelo (Turner et al., 2013). Además, cepas en estado de dormancia o viables pero no cultivables no son detectadas (Cruz-Leyva et al., 2015), y solo se recupera menos del 1% de la diversidad real. El manejo agrícola intensivo previo también puede alterar la estructura microbiana y los procesos del ecosistema de manera compleja (Fraterrigo et al., 2006). Por lo tanto, es crucial considerar tanto el activador biológico como otros factores ambientales para entender las variaciones en la abundancia bacteriana.

2. Actividad microbiana

En lo que respecta a la respiración microbiana, en ninguna de las parcelas se encontraron diferencias significativas entre el testigo y el activador, para ninguno de los tres sitios. Se observó un aumento no significativo de la respiración en soja sitio Timbó. En un estudio llevado a cabo en plantaciones de cítricos en España se analizó la actividad microbiana frente a diferentes prácticas agrícolas. Se comparó el manejo agrícola intensivo (con uso de fertilizantes químicos) con el manejo orgánico, y se observó un aumento significativo en la actividad microbiana (aunque los valores fueron bajos) en las parcelas con manejo orgánico (Morugán-Coronado et al., 2015). Es de relevancia destacar, que la actividad microbiana no se determinó con el mismo método que en este trabajo. Los resultados del estudio sugieren que el manejo del suelo tiene un impacto significativo en la actividad microbiana. Sin embargo, los efectos de los tratamientos específicos, como el activador biológico en el caso de este estudio, pueden variar y no siempre se reflejan en diferencias significativas. A pesar de que la literatura sugiere que las prácticas que emplean menor cantidad de agroquímicos y activadores biológicos, tienden a favorecer la actividad microbiana en comparación con los suelos agrícolas gestionados convencionalmente, y que la misma cambia más rápidamente que las comunidades microbianas ante estos manejos (Burger y Jackson, 2003), en este caso no se pudo observar dicho comportamiento. Esto podría deberse a diversas razones tales como: la eficacia del activador, las condiciones del suelo, o quizás, limitaciones en la metodología.

Es necesario considerar, para investigaciones futuras, estos factores y realizar más experimentos o ajustar el diseño experimental para explorar más a fondo estos efectos; pudiendo complementar el análisis microbiológico clásico utilizando técnicas moleculares y métodos que evalúen la actividad enzimática del suelo. La misma, es un indicador biológico sensible a los efectos de las prácticas de manejo (Morugán-Coronado et al., 2015). Investigaciones en climas templados han demostrado que la actividad enzimática es a menudo el indicador más sensible de los cambios en las comunidades microbianas provocados por diferentes prácticas de manejo (Silva, 2024).

Consideraciones finales

La abundancia y actividad microbiana de los microorganismos no mostraron diferencias significativas en la mayoría de los casos; en los que se observaron diferencias significativas, no siempre se tradujeron en un aumento de la abundancia respecto al testigo. No obstante, se registraron cambios en comparación con el testigo, aunque estos no siempre fueron significativos.

Finalmente, para una evaluación más exhaustiva, es aconsejable complementar el análisis con técnicas moleculares avanzadas, tanto cuantitativas como cualitativas e incluir técnicas que midan la actividad enzimática para obtener una visión más completa. Estas técnicas proporcionarán una caracterización más precisa de las comunidades microbianas y sus funciones. La combinación de estos enfoques ofrecerá una comprensión más profunda del efecto del activador y permitirá optimizar su aplicación en prácticas agrícolas sostenibles

Anexo

1. Medios de cultivo

Starch Casein Agar (SCA) (Leoni y Ghini, 2003)		Tryptic Soy Agar 1/10 (TSA 1/10) (Smit et al., 2001)		Medio para Hongos Filamentosos Agar-Malta (700 ml)	
Almidón	10 g	TSB	3 g	Extracto de malta	14 g
Caseína	0,3 g	Agar	15 g		
KNO ₃	2 g	Agua desionizada	1000 ml c.s.p	Agar	11,2 g
NaCl	2 g	Medio para detección de bacterias amonificantes (Seeley et al., 1991)			
K ₂ HPO ₄	2 g				
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g			Medio King's B (KB) para detección de <i>Pseudomonas Fluorescentes</i>	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g	Peptona	40 g	Peptona N°3	20 g
Agar	16 g	Agua desionizada	1000 ml c.s.p	K ₂ HPO ₄	1,5 g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p			MgSPO ₄	1,5 g
				Agar	18 g
				Agua destilada	1000 ml c.s.p
				Glicerol	10 ml

2. Reactivo de Nessler

Se preparan por separado las soluciones A y B y se dejan enfriar. Se agrega la solución B a la solución A y se lleva el volumen a 500 mL con agua destilada. Se deja decantar durante una semana antes de su uso. Se guarda a temperatura ambiente y en oscuridad (Seely et al., 1991).

Solución A		Solución B	
Ioduro de Potasio	35 g		
Ioduro de Mercurio	50 g	NaOH	50 g
Agua destilada	200 ml	Agua destilada	250 ml

3. Soluciones

Pirofosfato de Sodio Se llevó el pH a 7 con HCl 10 N	
Pirofosfato de Sodio decahidratado	1,68g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p

4. Tablas de Abundancia

Tabla 2: Abundancias y actividades microbianas al momento inicial del ensayo. Las abundancias están expresados en UFC/g de suelo seco mientras que las actividades microbianas están expresadas como mg C-CO₂/Kg suelo seco.

	Heterótrofos	Actinobacterias	Hongos	Levaduras	Amonificantes	Respiración
CITRUS	Abundancia (UFC/ g suelo seco)					mg C-CO ₂ /Kg suelo seco
C1	5,72E+07	1,18E+06	1,24E+05	0,00E+00	1,05E+07	2,77
C2	2,38E+07	9,49E+05	2,29E+04	1,06E+05	1,04E+07	0,6
C6	6,26E+07	1,91E+06	4,49E+04	0,00E+00	1,23E+08	0,96
C7	3,99E+07	9,98E+05	2,99E+04	2,16E+06	1,66E+07	5,21
SOJA-TIMBÓ						
T1	4,57E+07	4,57E+06	3,52E+04	3,30E+04	1,00E+06	3,76
T2	3,22E+07	3,72E+06	1,17E+05	3,33E+04	1,01E+06	4,15
T3	2,80E+07	3,70E+06	7,11E+04	0,00E+00	4,82E+06	0,6
SOJA-TRES AGUAS						
TA1	1,46E+07	2,31E+06	2,08E+04	_____	4,84E+06	8,78
TA2	1,26E+07	2,12E+06	3,35E+04	_____	2,57E+06	9,42
TA3	1,01E+07	4,26E+06	3,81E+04	_____	1,04E+07	8,03

Tabla 3: Abundancias y actividades microbianas a 6 meses de la aplicación del activador biológico para las condiciones de Testigo y Activador. Los valores medios de 3 repeticiones por sitio están expresados en UFC/g de suelo seco, para las abundancias y como mg C-CO₂/Kg suelo seco, para las actividades microbianas. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas, mientras que las letras diferentes indican que sí existen diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

	Heterótrofos	Actinobacterias	Hongos	Levaduras	<i>Bacillus spp</i>	<i>Pseudomonas fluorescentes</i>	Amonificantes	Respiración
CITRUS- EL REPECHO	Abundancia (UFC/ g suelo seco)							mg C-CO ₂ /Kg suelo seco
Testigo	3.48E+07	1.43E+06	2.39E+04	_____	5.19E+05	5.62E+04	1.23E+07	1.06
	a/a	a/a	a/a	_____	a/a	a/b	a/b	a/a
Activador	2.98E+07	1.07E+06	3.21E+04	_____	3.95E+05	1.58E+04	3.55E+06	1.04
SOJA-TIMBÓ								
Testigo	2,76E+07	8,70E+06	4,63E+04	3,53E+04	3,44E+06	4,61E+03	9,92E+06	2,33
	a/a	a/a	a/b	a/a	a/b	a/a	a/a	a/a
Activador	2,25E+07	8,13E+06	3,76E+04	7,43E+05	3,48E+06	7,42E+04	2,16E+06	3,05
SOJA-TRES AGUAS								
Testigo	2,13E+06	3,48E+06	5,03E+04	1,32E+04	1,23E+06	6,22E+03	2,26E+06	1,20
	a/a	a/b	a/a	a/a	a/a	a/b	a/a	a/a
Activador	4,70E+06	4,66E+06	1,46E+05	2,48E+04	2,01E+06	7,09E+04	2,71E+06	1,32

5. Scripts de R-Studio

Test de Shapiro-Wilk W Test

```
datos <- c(N1, N2, N3, N4, N5, N6)
resultado_shapiro <- shapiro.test(datos)
print(resultado_shapiro)
```

Test de Bartlett

```
# Datos del Grupo 1
grupo1 <- c(N1, N2, N3)
# Datos del Grupo 2
grupo2 <- c(N4, N5, N6)
# Crear un vector que indique los grupos
grupos <- rep(c("Grupo 1", "Grupo 2"), each = 3)
# Realizar el test de Bartlett
resultado_bartlett <- bartlett.test(list(grupo1, grupo2))
# Mostrar el resultado del test
print(resultado_bartlett)
```

ANOVA de Una Vía

```
# Datos del Grupo 1
grupo1 <- c(N1, N2, N3)
# Datos del Grupo 2
grupo2 <- c(N4, N5, N6)
# Crear un data frame con los datos y los grupos
datos <- data.frame(
  valor = c(grupo1, grupo2),
  grupo = factor(rep(c("Grupo 1", "Grupo 2"), each = 3))
)
# Mostrar el data frame
```

```
print(datos)

# Realizar ANOVA de una vía

resultado_anova <- aov(valor ~ grupo, data = datos)

# Mostrar el resumen del ANOVA

summary(resultado_anova)
```

Test de Kruskal-Wallis

```
# Datos del Grupo A

grupo_a <- c(N1, N2, N3)

# Datos del Grupo B

grupo_b <- c(N4, N5, N6)

# Combinar los datos en un vector único

datos <- c(grupo_a, grupo_b)

# Crear un factor que identifique los grupos

grupo <- factor(rep(c("A", "B"), each = 3))

# Realizar el test de Kruskal-Wallis

resultado_kruskal <- kruskal.test(datos ~ grupo)

# Mostrar el resultado del test

print(resultado_kruskal)
```

Referencias bibliográficas

- **Abawi, G., y Widmer, T.** (2000). Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 37-47. [https://doi.org/10.1016/s0929-1393\(00\)00070-6](https://doi.org/10.1016/s0929-1393(00)00070-6)
- **Acosta-Martínez V., Acosta-Mercado D., Sotomayor-Ramírez D.Cruz-Rodríguez L.** (2008). Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils. *Applied Soil Ecology*, 38(3), 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.10.012>
- **Agaras, B., Wall, L. G., y Valverde, C.** (2012). Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable *pseudomonads* in agricultural soils under no-till management in Argentina. *Applied Soil Ecology*, 61, 305-319. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.016>
- **Agrios, G. N.** (1995). Fitopatología. México, 530 p.
- **Álvarez-García, J., Santoyo, G., y Del Carmen Rocha-Granados, M.** (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 16(1), 01-10. <https://doi.org/10.33154/rln.2020.01.01>
- **Anderson, J. P. E.** (1985). Soil respiration. In A. L. Page (Ed.), *Methods of soil analysis, part 2* (2nd ed., pp. 837-887). Soil Science Society of America.
- **Bajsa, N.** (2008). Efecto del pastoreo bovino sobre la comunidad bacteriana en un suelo de pradera natural. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- **Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H., Clément C., Ouhdouch Y., Van Wezel G. P.** (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinomycetota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00019-15>
- **Barrueco R., Sevillano F., y Subramaniam P.** (1984). La fijación de nitrógeno atmosférico. Una biotecnología en la producción agraria. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. 1ª Edición. 64 p. https://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/agroambiente/nitrogeno_atmosferico.pdf
- **Beare, M., Coleman, D., Crossley, D., Hendrix, P., y Odum, E.** (1995). A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil*, 170(1), 5–22. <https://doi.org/10.1007/bf02183051>

- **Benizri, É., Dedourge, O., Dibattista-Leboeuf, C., Piutti, S., Nguyen, C., y Guckert, A.** (2002). Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology*, 21(3), 261-265. [https://doi.org/10.1016/s0929-1393\(02\)00094-x](https://doi.org/10.1016/s0929-1393(02)00094-x)
- **Berg G.** (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- **Bhattacharyya, P. N., y Jha, D. K.** (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- **Bettucci, L. y Roquebert, M.** (1995). Microfungi from a tropical rain forest litter and soil: a preliminary study. En: *Nova Hedwigia*, 61, pp.111-118.
- **Bossis E., Lemanceau P., Latour X., Gardan L.** (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20(1), 51–63. <https://doi.org/10.1051/agro:2000112>
- **Botelho, G. R., y Mendonça-Hagler, L. C.** (2006). Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops: an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 401-416. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822006000400001>
- **Burger, M., y Jackson, L. E.** (2003). Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(1), 29–36. doi:10.1016/s0038-0717(02)00233-x
- **Calvo P., y Zúñiga D** (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31-39.
- **Cañón-Cortázar R.G., Avellaneda-Torres L. y Torres-Rojas E.** (2012). Microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno en suelos bajo tres sistemas de uso: cultivo de papa, ganadería y páramo, en el Parque Los Nevados, Colombia. *Acta Agronómica*, 61, 371-379.

- **Corsi S., Ruggeri G., Zamboni A., Prinsi B., Espen L., Ferrante A., Nosedà M., Varanini Z., Scarafoni A.** (2022). A bibliometric analysis of the scientific literature on biostimulants. *Agronomy*, 12(6), 1257. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061257>
- **Cruz-Leyva, M., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A., González-de la Cruz, J., & Rojas-Herrera, R.** (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 99-115. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282015000100008&lng=es&esytlng=es
- **Du Jardin, P.** (2012). The science of biostimulants: A bibliographic analysis. Contract 30-CEO455515/00-96. Abril 2012. Disponible en: ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/files/fertilizers/final_report_bio_2012_en.pdf [Google Scholar]
- **Dixon, G. R., y Tilston, E. L.** (2010). Soil Microbiology and Sustainable Crop Production. En *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9479-7>
- **Duineveld, B. M., Kowalchuk, G. A., Keijzer, A., van Elsas, J. D., y van Veen, J. A.** (2001). Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 172–178.
- **Estrada-Salazar G., y Ramírez-Galeano M.** (2019). *Micología general*. 1ed. Manizales (Colombia): Centro Editorial Universidad Católica de Manizales. ISBN 978-958-52337-1-3, 40 p.
- **FoliarBlend - Agrigro | FEMSSA.** (s. f.). <http://www.femssa.com.mx/agrigro/foliar-blend-agrigro-femssa.php#:~:text=Agrigro%20FoliarBlend%20es%20un%20prebi%C3%B3tico,factores%20ambientales%20y%20aplicaciones%20qu%C3%ADmicas>.
- **Fraterrigo, J. M., Balsler, T. C., y Turner, M. G.** (2006). Microbial community variation and its relationship with nitrogen mineralization in historically altered forests. *Ecology*, 87(3), 570-579. <https://doi.org/10.1890/05-0638>

- **Frioni, L.** (2006). Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Uruguay.
- **Geels, F., y Schippers, B.** (1983). Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Journal of Phytopathology*, 108(3–4), 193–206. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1983.tb00579.x>
- **Giannone N.** (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias nativas del género *Bacillus*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias-UDELAR.
- **Giri, B., Giang, P.H., Kumari, R., Prasad, R., Varma, A.** (2005). Microbial Diversity in Soils. In: Varma, A., Buscot, F. (eds) *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Soil Biology, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_2
- **Glodowska M., y Wozniak M.** (2019) Changes in soil microbial activity and community composition as a result of selected agricultural practices. *Agricultural Sciences*, 10, 330-351. doi: [10.4236/as.2019.103028](https://doi.org/10.4236/as.2019.103028).
- **Gómez, J. E. P.** (2018). Actividad microbiológica y biomasa microbiana en suelos cafetaleros de los Andes venezolanos. *Terra Latinoamericana*, 36(1), 13. <https://doi.org/10.28940/terra.v36i1.257>
- **Gorgoroso F.** (2012). Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos pertenecientes al grupo *Bacillus subtilis*. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- **Gould, W.D., Hagedorn, C., Bardinelli, T.R. and Zablutowicz, R.M.** (1985) new selective media for enumeration and recovery of fluorescent *pseudomonads* from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 28-32.
- **Hunter-Cevera, J.C.** (1998). The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*. 1: 278-285
- **Kaschuk, G., Alberton, O., Hungria, M.** (2010). Quantifying effects of different agricultural land uses on soil microbial biomass and activity in Brazilian biomes: inferences to improve soil quality. *Plant and Soil*, 338(1–2), 467–481. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0559-z>

- **Kennedy, A.** (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 74(1-3), 65-76. [https://doi.org/10.1016/s0167-8809\(99\)00030-4](https://doi.org/10.1016/s0167-8809(99)00030-4)
- **King, E., Ward, M., Raney, D.** (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301-307.
- **Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M. M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., y Trevors, J. T.** (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169-188.
- **Kuramae, E. E., Yergeau, E., Wong, L. C., Pijl, A. S., Veen, J. A., y Kowalchuk, G. A.** (2011). Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 12-24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x>
- **Leoni, C. y Ghini, R.,** (2003). Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 67-75.
- **Lupwayi N. Z., Rice W. A., Clayton G.W.** (1998). Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biology y Biochemistry*, 30(13), 1733–1741. [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(98\)00025-x](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(98)00025-x)
- **Madigan M.T., Martinko J. M., Bender, K.S., Stahl D. A., Buckley D. H.** (2015) .Brock. *Biología de los microorganismos*, 14th Ed. Pearson- Prentice-Hall.
- **McBratney, A., y Hartemink, A. E.** (2024). Define soil. *Soil Security*, 14, 100135. <https://doi.org/10.1016/j.soisec.2024.100135>.
- **Meliani, A., Bensoltane, A., y Mederbel, K.** (2011). Microbial diversity and abundance in soil: related to plant and soil type. *American Journal Of Plant Nutrition And Fertilization Technology*, 2(1), 10-18. <https://doi.org/10.3923/ajpnft.2012.10.18>
- **Mishra, J., y Arora, N. K.** (2018). Secondary metabolites of *fluorescent pseudomonads* in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 125, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.004>
- **Morugán-Coronado A., García-Orenes F., y Cerdà A.** (2015). Changes in soil microbial activity and physicochemical properties in agricultural soils in Eastern Spain. *Spanish Journal of Soil Science*, 5. <https://doi.org/10.3232/sjss.2015.v5.n3.02>

- **Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., y Hattori, M.** (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98(21), 12215-12220. <https://doi.org/10.1073/pnas.211433198>
- **Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L., y Serrano-Canaviri, T.** (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal Of The Selva Andina Research Society*, 8(1), 2-25. <https://doi.org/10.36610/j.isars.2017.080100002>
- **Perotti, E., Menéndez, L., Gaia, O., y Pidello, A.** (2005). Supervivencia de *Pseudomonas fluorescens* en suelos con diferente contenido de materia orgánica. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(2), 102-105. https://www.researchgate.net/profile/Alejandro_Pidello2/publication/242243439_Supervivencia_de_Pseudomonas_fluorescens_en_suelos_con_diferente_contenido_de_materia_organica/links/55bf97ea08aed621de139b3c.pdf
- **Riera N.** (2012). Purificación y caracterización de un metabolito antifúngico producido por *Pseudomonas fluorescens* CFBP 2392. Tesis de grado. Facultad de Ciencias-UDELAR.
- **Sarabia, M., Carreón-Abud, Y., López Bucio, J., Martínez, M., Azcón González de Aguilar, R., y Larsen, J.** (2014). Diversidad y abundancia de levaduras en agroecosistemas de maíz. En *Actas del III Simposio Nacional de Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable*. Ciudad de Zacatecas, México. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10261/278658>
- **Seeley H.W., Vandermark P.J., y Lee J.J.** (1991). *Microbes in action: a laboratory manual*. W.H ... Freeman and Company, New York, USA. 4ta Edición, p. 389-391.
- **Senatore, D.** (2013). Vinaza como fertilizante de caña azucarera: efecto sobre la comunidad bacteriana del suelo. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

- **Silva Marrero, C.** (2024). Evaluación microbiológica de productos agronómicos comerciales orgánicos (Microgeo®) en suelos de Uruguay. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- **Singh, J. S., Pandey, V. C., y Singh, D.** (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 140(3-4), 339-353. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017>
- **Sivasakthi, S., Usharani, G., y Saranraj, P.** (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal Of Agricultural Research*, 9(16), 1265-1277. <https://doi.org/10.5897/ajar2013.7914>
- **Smit E., Leeflansg P., Gommans S., van den Broek J., van Mil S., and Wernars K.** (2001). Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2284-2291.
- **Suárez-Contreras, L. Y., y Peñaranda-Figueroa, F. A.** (2022). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 20(1), 194-206. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v20.n1.2022.1914>
- **Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., y Heydrich-Pérez, M.** (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*. <https://doaj.org/article/0f1b475017f5405094b63e11b26c618f>
- **Turner TR., James EK. y Poole PS.** (2013) The plant microbiome. *Genome Biol.* 25; 14(6):209. doi: 10.1186/gb-2013-14-6-209.
- **Urban M.** (2008). Explorations of metagenomes for new enzymes useful in food biotechnology – A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58(1): 11-22.
- **Wajswol Martella, S.** (2018). Efecto de la aplicación de vinaza en cultivos de caña de azúcar: estudio de la comunidad bacteriana. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

- **Wieland, G., Neumann, R., y Backhaus, H.** (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(12), 5849-5854. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5849-5854>
- **Zitz, U., Domig, K. J., Hoehl, A., Weiss, H., Wilrich, P., y Kneifel, W.** (2011). Evaluation of three applications of a semi-automated most-probable-number method for the assessment of microbiological parameters in dairy products. *Accreditation And Quality Assurance*, 16(6), 299-309. <https://doi.org/10.1007/s00769-011-0772-3>