

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Microbiología

PEDECIBA-Biología

***Vinaza como fertilizante de caña
azucarera: efecto sobre la
comunidad bacteriana del suelo***

Daniella Senatore

Orientadora: Alicia Arias

Co-Orientadora: Natalia Bajsa

Tribunal:

Dr. Jorge Monza

Dra. Silvia Batista

Dra. María Inés Siri

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

2013

AGRADECIMIENTOS



FINANCIACIÓN

- ANCAP en el marco del proyecto de vinculación ANCAP-UDELAR 2009 denominado “Determinación de los cambios físicos químicos y biológicos en suelos cultivados con caña de azúcar en Bella Unión por aplicación de vinaza”
- CSIC en el marco de la beca de finalización de posgrado 2012
- Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Microorganismos del suelo	2
1.1. <i>Actinobacterias</i>	3
1.2. <i>Bacterias del ciclo de nitrógeno: amonificantes, desnitrificantes y nitrificantes</i>	5
2. Prácticas agrícolas y comunidades microbianas del suelo	7
3. Producción de bioetanol y generación de vinaza	8
4. Utilización de vinaza para fertirriego y sus efectos sobre los microorganismos del suelo	11
OBJETIVOS.....	13
1) General.....	13
2) Específicos	13
HIPÓTESIS	13
ESTRATEGIA	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1. Sitios de muestreo	15
2. Obtención de muestras de suelo	18
3. Determinación de humedad.....	18
4. Cuantificación de bacterias por recuento en placa y por la técnica del número más probable (NMP).....	20
5. Medida de actividad microbiana por respirometría	21
6. Extracción de ADN	21
7. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	21
8. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....	22

9.	Real Time PCR (rt-PCR).....	22
10.	Análisis de datos	23
10.1.	<i>Corrección del porcentaje de humedad del suelo</i>	23
10.2.	<i>Recuentos bacterianos y NMP</i>	23
10.3.	<i>Real Time PCR</i>	23
10.4.	<i>Respiración microbiana</i>	24
10.5.	<i>Análisis estadísticos</i>	24
10.6.	<i>DGGE</i>	25
RESULTADOS		26
1.	Abundancia de bacterias cultivables en suelos con y sin vinaza	26
2.	Actividad microbiana.....	36
3.	Caracterización molecular de la comunidad bacteriana en suelos con y sin vinaza	38
3.1.	<i>Cuantificación de bacterias totales por Real Time PCR (rt-PCR)</i>	39
3.2.	<i>Análisis de diversidad del dominio Bacteria mediante PCR-DGGE</i>	42
DISCUSIÓN		48
1.	Abundancia de bacterias cultivables en suelos con y sin vinaza	48
2.	Actividad microbiana.....	52
3.	Caracterización de la diversidad bacteriana molecular en suelos con y sin vinaza	54
3.1.	<i>Cuantificación de bacterias totales por Real Time PCR (rt-PCR)</i>	54
3.2.	<i>Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana mediante PCR-DGGE</i> . 55	
4.	Consideraciones finales.....	58
CONCLUSIONES		60
PERSPECTIVAS		61
ANEXO		62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características granulométricas del horizonte superficial del suelo en los sitios 1 y 2.	16
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del suelo en el horizonte superficial de los sitios 1 y 2.	16
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de la vinaza aplicada.	16
Tabla 4. Cronograma del ensayo. Se presentan los tiempos en que se realizaron los muestreos, la siembra y el tapado de la caña en cada parcela, respecto a la fecha de aplicación de vinaza.	19
Tabla 5. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.	27
Tabla 6. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.	28
Tabla 7. Abundancia de bacterias amonificantes en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.....	29
Tabla 8. Abundancia de bacterias desnitrificantes en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.....	30
Tabla 9. Abundancia de bacterias nitritantes en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.	30
Tabla 10. Abundancia de bacterias nitratantes en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.	31
Tabla 11. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.....	32
Tabla 12. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.	33
Tabla 13. Abundancia de bacterias amonificantes en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.....	34
Tabla 14. Abundancia de bacterias desnitrificantes en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.....	34
Tabla 15. Abundancia de bacterias nitritantes en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.	35

Tabla 16. Abundancia de bacterias nitratantes en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.	36
Tabla 17. Actividad microbiana en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.	36
Tabla 18. Actividad microbiana en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.	37
Tabla 19. Abundancia de bacterias totales en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.	40
Tabla 20. Abundancia de bacterias totales en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.	41
Tabla 21. Resumen de los principales efectos causados por la vinaza sobre las variables microbianas analizadas en ambos sitios y cada muestreo	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del Nitrógeno	5
Figura 2. Ilustración simplificada de la producción de bioetanol	10
Figura 3. Mapa del Departamento de Artigas	15
Figura 4. Esquema del diseño experimental del sitio 1	17
Figura 5. Esquema del diseño experimental del sitio 2	17
Figura 6. Sitios en donde se realizaron los muestreos.	18
Figura 7. Visualización de los resultados de algunos ensayos utilizados para estudiar bacterias cultivables	26
Figura 8. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo en el sitio 1. ...	27
Figura 9. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo en el sitio 1.	28
Figura 10. Abundancia de bacterias amonificantes en muestras de suelo en el sitio 1	29
Figura 11. Abundancia de bacterias desnitrificantes en muestras de suelo en el sitio 1.	30
Figura 12. Abundancia de bacterias nitritantes en muestras de suelo en el sitio 1.	31
Figura 13. Abundancia de bacterias nitratantes en muestras de suelo en el sitio 1.	31
Figura 14. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo en el sitio 2.	32
Figura 15. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo en el sitio 2.	33
Figura 16. Abundancia de bacterias amonificantes en muestras de suelo en el sitio 2.	34
Figura 17. Abundancia de bacterias desnitrificantes en muestras de suelo en el sitio 2.	35
Figura 18. Abundancia de bacterias nitritantes en muestras de suelo en el sitio 2.	35
Figura 19. Abundancia de bacterias nitratantes en muestras de suelo en el sitio 2.	36
Figura 20. Actividad microbiana en muestras de suelo en el sitio 1.	37
Figura 21. Actividad microbiana en muestras de suelo en el sitio 2.	38
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN a partir de muestras de suelo con y sin vinaza.	38

Figura 23. Curva de calibración obtenida a partir de una reacción de PCR en tiempo real	39
Figura 24. Curva de amplificación obtenida a partir de una reacción de rt-PCR de algunas de las muestras de suelo de interés y del ADN estándar	40
Figura 25. Abundancia de bacterias totales en muestras de suelo en el sitio 1.	41
Figura 26. Abundancia de bacterias totales en muestras de suelo en el sitio 2.	41
Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para un fragmento del gen del ARNr 16S de <i>Bacteria</i>	42
Figura 28. Gel de DGGE de los productos de PCR para <i>Bacteria</i>	43
Figura 29. Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad de <i>Bacteria</i> antes de la aplicación de vinaza	44
Figura 30. Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad de <i>Bacteria</i> en muestras de suelo del sitio 1 luego de 18 días de aplicada la vinaza	45
Figura 31. Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad de <i>Bacteria</i> ...	47

RESUMEN

La producción de bioetanol genera una gran cantidad de subproductos que pueden ser muy nocivos para el ambiente si no se manejan y utilizan adecuadamente. La vinaza es un efluente que se obtiene de la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar, caracterizado por un alto contenido de materia orgánica, potasio y otros elementos. Debido a la elevada carga en materia orgánica su vertido en cursos de agua sin previo tratamiento se torna inviable. A su vez, los minerales que componen la vinaza podrían reemplazar en mayor o menor medida los requerimientos nutritivos de diferentes cultivos. Por dichas razones es que en otros países ya es utilizada para fertirriego por poseer nutrientes para el crecimiento vegetal, como una alternativa al tratamiento de la misma. Los microorganismos influyen en el crecimiento de las plantas participando en ciclos biogeoquímicos, aumentando la disponibilidad de nutrientes, regulando su crecimiento mediante la producción de hormonas, causando enfermedades o antagonizando patógenos. Al aplicar vinaza, la actividad microbiológica del suelo podría verse afectada.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar los cambios de la comunidad microbiana del suelo tratado con vinaza. Se tomaron muestras de dos sitios con suelos distintos representativos de la zona (ALUR - Bella Unión), antes y después de la aplicación de vinaza, en tres concentraciones diferentes (150, 300 y 450 m³/ha); se utilizó como control una parcela que no recibió vinaza. Se determinó la abundancia y actividad microbianas por técnicas bioquímicas y de biología molecular. También se evaluó el impacto de la aplicación de vinaza sobre la estructura de la comunidad bacteriana. En el sitio 1 la vinaza promovió un aumento de las poblaciones cultivables de bacterias heterótrofas, bacterias amonificantes y actinobacterias, mientras que en el sitio 2 la vinaza aumentó la respiración microbiana. No se observaron diferencias significativas en la abundancia de bacterias totales, determinada mediante PCR en tiempo real. Para visualizar el efecto sobre la estructura de la comunidad bacteriana se realizó DGGE a partir de productos de PCR del gen del ARNr 16S. Se observó un efecto de la vinaza sobre la estructura de la comunidad bacteriana, principalmente en el sitio 2.

Los resultados obtenidos indican que la aplicación de vinaza genera efectos diferentes sobre los distintos grupos microbianos dependiendo de la dosis utilizada y del tipo de suelo estudiado. Se observó también que dichos efectos fueron temporales ya que perduraron por algunos meses y luego los parámetros estudiados volvieron a parecerse al control.

INTRODUCCIÓN

1. Microorganismos del suelo

Todos los organismos de la biosfera dependen de la actividad microbiana. Los microorganismos son vitales para la continuidad de los ciclos de nutrientes y son esenciales para la productividad y estabilidad de los ecosistemas. Los microorganismos del suelo juegan un rol importante en los ciclos biogeoquímicos, y son responsables del ciclo de los compuestos orgánicos, contribuyendo en la nutrición de las plantas, estructura y fertilidad del suelo (Kennedy, 1999).

La abundancia de organismos y actividad no está distribuida al azar en el suelo, sino que varía horizontal y verticalmente a través del mismo. En particular, la heterogeneidad descrita en algunos estudios se correlaciona con la presencia de gradientes y variación en las propiedades del suelo que involucran la densidad, agregación, textura, concentración de O₂, pH, humedad, contenido orgánico, disponibilidad de N y dinámica vegetal (Kirk *et al.*, 2004).

La estimación de la biomasa microbiana contribuye al conocimiento del estado de la calidad y fertilidad del suelo. Varios métodos han sido propuestos para medir la biomasa microbiana en suelos, entre los que se encuentran el conteo de microorganismos, extracción del material orgánico microbiano, así como su correlación con parámetros fisiológicos como la producción de CO₂ y actividades enzimáticas (Paul, 2007).

El conocimiento detallado de la diversidad microbiana del suelo es complejo, en parte debido a las dificultades para estudiar a los microorganismos que allí habitan. La diversidad microbiana recuperable a partir de métodos estándares de cultivo usualmente se encuentra por debajo del 1% de la diversidad presente en muestras ambientales complejas como ser el suelo (Lorenz *et al.*, 2002). Es posible que este 1% de bacterias cultivables sea representativo de toda la población y que el otro 99% esté simplemente en un estado fisiológico que imposibilita su cultivo. Sin embargo, también es probable que el 99% sea fenotípica y genotípicamente diferente al 1% y únicamente la minoría de la población esté representada (Hunter-Cevera, 1998). A través del cultivo de los microorganismos se puede obtener información sobre la población heterótrofa activa (microorganismos cuya fuente de C son compuestos orgánicos).

Dependiendo de los medios de cultivo utilizados se pueden discriminar distintos organismos a través de su crecimiento en medios selectivos, así como cuantificarlos de acuerdo a capacidades metabólicas (ej.: microorganismos nitrificantes y desnitrificantes). El reciente desarrollo de técnicas de biología molecular ha permitido avanzar en la superación de los problemas asociados a los microorganismos no cultivables.

Los métodos de ecología microbiana molecular se basan en el análisis de ácidos nucleicos proporcionando una imagen más amplia de las comunidades microbianas del suelo dado que

contempla tanto los miembros de la comunidad cultivables como los no cultivables, que son los que generalmente predominan (Kirk *et al.*, 2004; Kuske *et al.*, 2002). Muchos de estos métodos se basan en el análisis del gen que codifica para el ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr) ya que permite la identificación y predicción de relaciones filogenéticas (Rondon *et al.*, 1999; Kirk *et al.*, 2004).

Utilizando diversas técnicas moleculares, Øvreås y Torsvik (1998) encontraron que la diferencia entre dos suelos agrícolas fue significativamente mayor cuando se analizó la población bacteriana total que cuando se estudió solamente la población cultivable. Por lo tanto, concluyeron que el análisis de la diversidad microbiana debe incluir el ADN de toda la comunidad microbiana y no sólo el ADN de las bacterias cultivables. Sin embargo, otros trabajos apoyan la hipótesis de que las bacterias del suelo fácilmente cultivables pueden ser los principales contribuyentes al funcionamiento del ecosistema. El efecto de la contaminación por metales se observó sólo en el análisis de bacterias cultivadas y no del ADN total de la comunidad. La porción cultivable de la comunidad microbiana es un parámetro ecológico importante, y es necesario evaluar su actividad, y no sólo la presencia o ausencia de sus integrantes (Ellis *et al.*, 2003).

Una alternativa es usar múltiples métodos para analizar una muestra dada en la mayor cantidad de niveles posible, aportando una imagen más completa de la diversidad microbiana y una evaluación más global de los cambios en su estructura y función (Rondon *et al.*, 1999; Kirk *et al.*, 2004).

Para establecer un buen indicador de la fertilidad del suelo es necesario el uso de microorganismos asociados a parámetros físicos y químicos del mismo. Adicionalmente, es necesario el estudio de determinados parámetros microbiológicos como ser las poblaciones de mayor sensibilidad a las perturbaciones, entre las cuales se encuentran las bacterias nitrificantes y las actinobacterias, y de sensibilidad moderada como ser bacterias desnitrificantes y amonificantes (Kennedy y Smith, 1995).

1.1. Actinobacterias

Los organismos unicelulares han habitado el mundo 2 o 3 billones de años más que cualquier otra forma de vida. Las bacterias constituyen una de las más diversas formas de vida en la Tierra ya que existen más de un millón de especies. En suelos, las bacterias son el grupo microbiano más numeroso, pero por su pequeño tamaño (1–10 µm) representan menos de la mitad de la biomasa total en suelos utilizados para la agricultura y se encuentran en poblaciones de entre 10^4 y 10^9 células por gramo de suelo (Kennedy, 1999; Vieites *et al.*, 2009).

El phylum *Actinobacteria* es uno de los grupos más grandes del dominio *Bacteria* conformado en gran parte, por bacterias ambientales pertenecientes a variados hábitats como ser suelos, rizósfera, ambientes marinos y ambientes áridos extremos (Miao y Davies, 2010).

En el suelo se encuentran en poblaciones de entre 10^6 y 10^9 células por gramo de suelo, y abarcan más del 30% de los microorganismos del mismo; sin embargo su aporte de biomasa es variable y mucho menor que la de los hongos (Kennedy, 1999). En términos numéricos y de especies identificadas, este phylum representa una de las unidades taxonómicas más grandes dentro de los 26 mayores linajes del dominio *Bacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997; NCBI, 2013), incluyendo 5 subclases y 18 subórdenes (Stackebrandt, 2000; NCBI, 2013).

Son organismos con una capacidad metabólica muy extensa ya que utilizan diferentes fuentes de energía y carbono; pueden ser autótrofos, heterótrofos, quimiótrofos o fotótrofos y tanto aerobios como anaerobios (Kennedy, 1999).

Las actinobacterias son bacterias Gram-positivas (Ventura *et al.*, 2007) y poseen un elevado contenido de guanina-citocina (65-75% G+C) en su ADN. El tamaño del genoma varía entre 2.5 Mb (*Micrococcus luteus*) a 9.7 Mb (en cepas ambientales de *Rhodococcus jostii*) (Miao y Davies, 2010).

Con respecto a su morfología exhiben una extensa variedad: desde simples cocos o bacilos hasta un desarrollo micelial característico de este grupo de microorganismos. Además poseen propiedades metabólicas y fisiológicas diversas, como ser la producción de enzimas extracelulares y de una amplia variedad de metabolitos secundarios (Ventura *et al.*, 2007). Muchos de estos metabolitos secundarios son antibióticos, que desde su descubrimiento en los años 40, han puesto en la mira a las actinobacterias, en particular especies de *Streptomyces* que se han convertido en la principal fuente de tratamientos farmacéuticos (Miao y Davies, 2010).

Las actinobacterias producen también otras sustancias como ser tiamina, rivo flavina, flavoproteínas y vitamina B₁₂, entre otras, que pueden promover o inhibir el crecimiento de otros organismos. Son también conocidas por producir un metabolito denominado geosmina, el cual genera el típico olor a suelo húmedo que caracteriza a estas bacterias (Kennedy, 1999).

Entre los microorganismos del suelo las actinobacterias son de gran interés porque producen metabolitos secundarios con funciones antibacterianas, antifúngicas e insecticidas que promueven indirectamente el crecimiento vegetal; también pueden hacerlo de forma directa mediante la producción de sustancias similares a las fitohormonas (Hamdali *et al.*, 2008), por lo que este grupo de microorganismos es considerado un componente muy importante de los agroecosistemas.

1.2. Bacterias del ciclo de nitrógeno: amonificantes, desnitrificantes y nitrificantes

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para todos los organismos, y como componente de las proteínas es fundamental en las estructuras y procesos bioquímicos que definen la vida.

El N existe en múltiples estados de oxidación y formas químicas, y es rápidamente convertido por microorganismos que habitan en el suelo o en el agua. El mayor reservorio de N en la Tierra se encuentra en forma de nitrógeno gaseoso (N_2), conformando un 78% de la atmósfera (Francis *et al.*, 2007).

De todos los ciclos biogeoquímicos, el ciclo del N (Figura 1) es el más estrechamente asociado a los microorganismos. Pasos únicos y esenciales del ciclo del N son llevados a cabo por una amplia gama de bacterias, arqueas y eucariotas (Ward *et al.*, 2007).

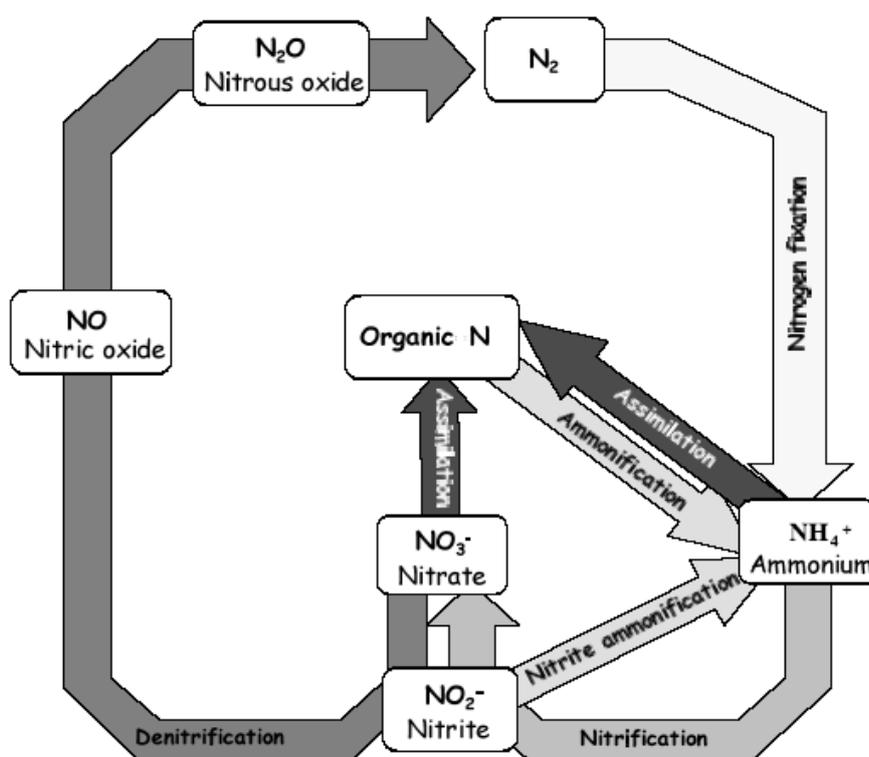


Figura 1. Ciclo del Nitrógeno (Tomada de Philippot y Germon, 2005).

Varias especies bacterianas se encuentran involucradas en el ciclo del nitrógeno; la amonificación y otras transformaciones del N son procesos llevados a cabo exclusivamente por algunas especies de microorganismos. Dentro de los organismos se puede encontrar al N en su estado más reducido que es rápidamente convertido a nitrato, mediante un proceso aerobio denominado nitrificación, al ser liberado luego de la muerte celular y la posterior lisis (transforman NH_3 a NO_2^- y NO_2^- a NO_3^-). A su vez, el nitrato es transformado en N_2 gaseoso, por parte de bacterias heterótrofas facultativas en condiciones restringidas de oxígeno, mediante un proceso denominado desnitrificación (Wessén y Hallin, 2011). La producción de

nitrate puede ocurrir tanto por vías heterótrofas como autótrofas. En la nitrificación quimioautótrofa participa un número limitado de géneros bacterianos aerobios autótrofos, mientras que en la nitrificación heterótrofa participa un grupo más amplio de organismos. En la desnitrificación participan especies bacterianas anaerobias obligadas y facultativas; los procesos de desasimilación de NO_3^- y reducción de NO_2^- son realizados por unas pocas especies bacterianas pertenecientes a una amplia distribución de géneros (Kennedy, 1999).

Las bacterias nitrificantes se pueden dividir, según su función metabólica, en bacterias oxidantes de amonio o bacterias nitritantes (transforman NH_3 a NO_2^-), generalmente pertenecientes al género *Nitrosomonas* y en bacterias que oxidan nitrito o bacterias nitratantes (transforman NO_2^- a NO_3^-), generalmente del género *Nitrobacter*.

La oxidación de amonio es el paso limitante en el proceso de nitrificación a través del cual se pierde N por la lixiviación de nitrato (Wessén y Hallin, 2011). La nitrificación autótrofa del amonio con frecuencia es dominante en suelos productivos y la nitrificación heterótrofa, por la cual los hongos convierten el N orgánico a nitrato sin una amonificación previa, es también considerable (Osanai *et al.*, 2011).

La desnitrificación es un proceso microbiano en donde compuestos nitrogenados oxidados son usados como aceptores de electrones alternativos para la producción de energía. Esta reacción, donde el nitrato es reducido a nitrógeno gaseoso (N_2) mediante metaloenzimas, ocurre en cuatro pasos (Fernández *et al.*, 2011). El primer paso es la reducción del nitrato a nitrito, luego la producción de óxido nítrico a partir de nitrito, en tercer lugar ocurre la reducción del óxido nítrico a óxido nitroso y finalmente la formación de N_2 ($\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO} - \text{N}_2\text{O} - \text{N}_2$) (Capone *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2007; Wessén y Hallin, 2011).

Las bacterias desnitrificantes se encuentran en toda clase de nichos ambientales y representan entre un 10% y 15% de la población bacteriana de suelos, aguas y sedimentos. Las bacterias capaces de llevar a cabo la desnitrificación son aisladas frecuentemente de suelos, sedimentos y ambientes acuáticos; la habilidad de desnitrificar se encuentra presente en muchos grupos bacterianos filogenéticamente diversos (Chèneby *et al.*, 2000).

Desde el punto de vista ambiental la desnitrificación posee efectos tanto positivos como negativos. Entre los efectos positivos se encuentra la disminución de la lixiviación de nitrato de los suelos a aguas superficiales y subterráneas, y que es el principal proceso biológico responsable de retornar el nitrógeno fijado a la atmósfera. En contraste, los efectos negativos de la desnitrificación son la contribución al efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y la pérdida de N disponible para el crecimiento vegetal (Fernández *et al.*, 2011).

El proceso de desnitrificación es considerado completo cuando el organismo desnitrificante posee el grupo completo de genes de desnitrificación (*nar/nap*, *nir*, *nor*, *nos*) que le confiere la

capacidad de reducir el nitrato hasta N_2 . Sin embargo, no todas las bacterias desnitrificantes poseen el grupo completo de genes, por lo que liberan nitrito u óxido nitroso como producto final; este proceso se denomina desnitrificación parcial (Fernández *et al.*, 2011).

La reacción de amonificación a partir de compuestos orgánicos es un proceso que puede darse tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Drazkiewicz, 1996). Algunas de las bacterias aerobias que participan de la primera etapa de amonificación son *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas* spp. entre otras; las bacterias anaerobias que podemos encontrar participando de este proceso son *Clostridium putrificum*, *Clostridium sporogenes* y *Clostridium tetani* (Fassbender y Bornemisza, 1987).

El proceso de amonificación comienza cuando los organismos producen compuestos de deshecho que contienen nitrógeno. Los animales tales como los mamíferos y anfibios adultos excretan urea en la orina, mientras que los reptiles, aves e insectos liberan ácido úrico en sus deshechos. La urea y el ácido úrico, junto con los compuestos nitrogenados provenientes de organismos muertos, son descompuestos liberando de este modo nitrógeno como NH_3 al medio abiótico. El NH_3 producido por la reacción de amonificación entra en el ciclo del nitrógeno quedando disponible para ser utilizado en las reacciones de nitrificación y de asimilación. La mayor parte de N disponible en el suelo deriva del nitrógeno orgánico reciclado por la amonificación (Berg, 2008).

2. Prácticas agrícolas y comunidades microbianas del suelo

La diversidad biológica consiste en la variedad de especies en los ecosistemas así como la variabilidad genética dentro de cada especie. Esto abarca todas las formas y niveles de vida, incluyendo el nivel genético, taxonómico y ecosistémico (Kennedy y Smith, 1995).

El suelo es concebido como un sistema complejo con propiedades físicas, químicas y biológicas que son de importancia vital para el logro de un óptimo desarrollo de los cultivos (González y Pomares, 2008). Los microorganismos del suelo, incluidos los hongos, los protozoarios, las arqueas y las bacterias, son esenciales para el correcto funcionamiento y la sustentabilidad de los ecosistemas. Se asume además que una alta diversidad microbiana es crítica para la estabilidad de los ecosistemas proporcionando diversidad y redundancia funcional. Se ha demostrado que cambios en la vegetación, así como el uso de prácticas agrícolas intensivas, afectan la actividad y composición de las comunidades microbianas además de las propiedades fisicoquímicas de los suelos (Ding *et al.*, 2013).

Las funciones que llevan a cabo los microorganismos son responsables de los ciclos de nutrientes y de los procesos geoquímicos de los suelos. Es por ello que la diversidad microbiana es crucial para el funcionamiento y la salud de los suelos. Por esta razón, existe la necesidad de entender la variabilidad espacial y temporal de la estructura y funciones de la

comunidad microbiana en respuesta a, por ejemplo, las prácticas agrícolas, la contaminación y el clima (Smalla *et al.*, 2007).

La diversidad microbiana puede tener un papel importante en la manutención de la calidad de los suelos organizándose en forma previsible en diferentes condiciones edáficas y en respuesta a distintos tipos de disturbios, por lo cual las comunidades microbianas podrían ser utilizadas como indicadores de calidad de suelos (Lambais *et al.*, 2005).

La degradación de las tierras usadas para la agricultura y la resultante pérdida de biodiversidad y productividad de los suelos generan gran preocupación. A pesar del gran progreso en la productividad agrícola en las últimas décadas, la degradación de los suelos ha reducido la capacidad productiva de los mismos en un 40% aproximadamente (Girvan *et al.*, 2003). Los suelos sufren degradación física así como erosión y compactación; la degradación química ocurre debido a la acidificación, al agotamiento de nutrientes, a la polución por residuos industriales y por el uso abusivo de fertilizantes y pesticidas. Finalmente, la degradación biológica se debe al agotamiento de la materia orgánica y a la pérdida de biodiversidad (Girvan *et al.*, 2003).

Las prácticas agrícolas como ser cultivos intensivos, laboreo y eliminación de los residuos de los cultivos, contribuyen al agotamiento de las reservas de materia orgánica de los suelos a nivel mundial. La aplicación de materiales ricos en materia orgánica como ser desechos provenientes de la industria alimentaria, estiércol de animales, lodos y compost, se ha vuelto una práctica agrícola común para reponer la materia orgánica y mejorar la estructura y fertilidad de los suelos (Bustamante *et al.*, 2010).

3. Producción de bioetanol y generación de vinaza

En la última década se ha experimentado un enorme cambio en el sistema energético orientándose hacia el uso de los biocombustibles, no solamente por la demanda de energía a nivel mundial sino también por las preocupaciones sobre el cambio climático. La producción de bioetanol a partir de caña de azúcar se está convirtiendo cada vez más en una importante fuente de energía alternativa a nivel mundial ya que se considera tanto económicamente como ambientalmente sustentable (Braga do Carmo *et al.*, 2012).

La expansión del sector bioenergético dará lugar a un gran aumento en la cantidad de residuos producidos. La sustentabilidad de una cadena bioenergética particular dependerá, en gran medida, de la posibilidad de reciclar los subproductos de deshecho que se originen a partir del proceso (Cayuela *et al.*, 2010; Galvez *et al.*, 2012). Dichos subproductos pueden contener grandes cantidades de C orgánico y una amplia gama de elementos nutritivos, por lo que son muy atractivos para ser utilizados como enmiendas o como fertilizantes; la intensificación en la producción del sector bioenergético es probable que aumente la cantidad de subproductos que serán, por lo tanto, devueltos al suelo (Galvez *et al.*, 2012).

El etanol obtenido a partir de la caña de azúcar ha sido propuesto como una de las mejores opciones para sustituir los combustibles de origen fósil. Estudios realizados a partir del ciclo de vida del bioetanol mostraron que el mismo emite aproximadamente un 80% menos de gases de efecto invernadero que la gasolina. Sin embargo la vinaza, uno de los principales productos de deshecho de este proceso, puede ser una fuente significativa de emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera. Dichas emisiones pueden resultar de la descomposición aerobia o anaerobia de la materia orgánica que contiene la vinaza y pueden ocurrir durante el transporte, almacenamiento o luego de la aplicación de la misma en los suelos (Gonçalves de Oliveira *et al.*, 2013).

La vinaza es un residuo líquido rico en materia orgánica, potasio, calcio, magnesio, azufre y nitrógeno que se obtiene durante la producción de etanol a partir de la caña de azúcar. Posee un color marrón oscuro y su pH varía entre 3.5 y 5 (España-Gamboa *et al.*, 2012). Por cada litro de etanol producido se obtienen aproximadamente 13 litros de vinaza que posee una alta carga contaminante con valores de DBO (demanda biológica de oxígeno) que varían entre 30 y 60 g O₂/L. En la vinaza se mantiene la materia soluble restante luego de la fermentación y destilación de la melaza de caña de azúcar así como los subproductos no volátiles de la fermentación, por lo cual es uno de los residuos industriales más recalcitrantes (Navarro *et al.*, 2000).

La producción de bioetanol en destilerías consta de cuatro etapas: preparación de la materia prima, fermentación, destilación y envasado. El etanol puede producirse a partir de varios tipos de biomasa, pero el potencial como materia prima depende del costo, la disponibilidad, el contenido de carbohidratos y la facilidad por la cual puede convertirse en alcohol (Mohana *et al.*, 2009). La materia prima que se utiliza puede ser a base de azúcar (caña de azúcar, melaza de remolacha y jugo de caña), a base de almidón (maíz, trigo, mandioca, arroz y cebada) o material celulósico (residuos de cosecha, bagazo de caña de azúcar y madera). Por lo general la materia prima a base de azúcar es la preferida con respecto al material a base de almidón o celulósico puesto que contiene azúcares fermentables fácilmente disponibles y no necesita de un tratamiento previo para obtener dichos azúcares fermentables (Satyawali y Balakrishnan, 2008).

El actual proceso de fermentación de caña de azúcar para obtención de etanol fue desarrollado en 1930 por Firmino Boinot en las destilerías francesas de la región de Melle y se patentó en 1937 (Figura 2). Las fermentaciones son llevadas a cabo a partir de mostos de jugo de caña, de melazas diluidas en agua o a partir de mezclas de ambas en un período de entre 6 y 12 horas. Al finalizar la fermentación se alcanza una concentración de alcohol de entre 7 y 11% (v/v) y los niveles residuales de azúcar que quedan en el vino son inferiores al 0,1%. El mosto fermentado se centrifuga para la separación de levaduras y vino.

El vino es sometido al proceso de destilación de donde se obtiene el etanol como producto de interés y vinaza como residuo, mientras que la suspensión concentrada de células de levadura es tratada con ácido sulfúrico con el objetivo de reducir la contaminación bacteriana (Amorim *et al.*, 2011).

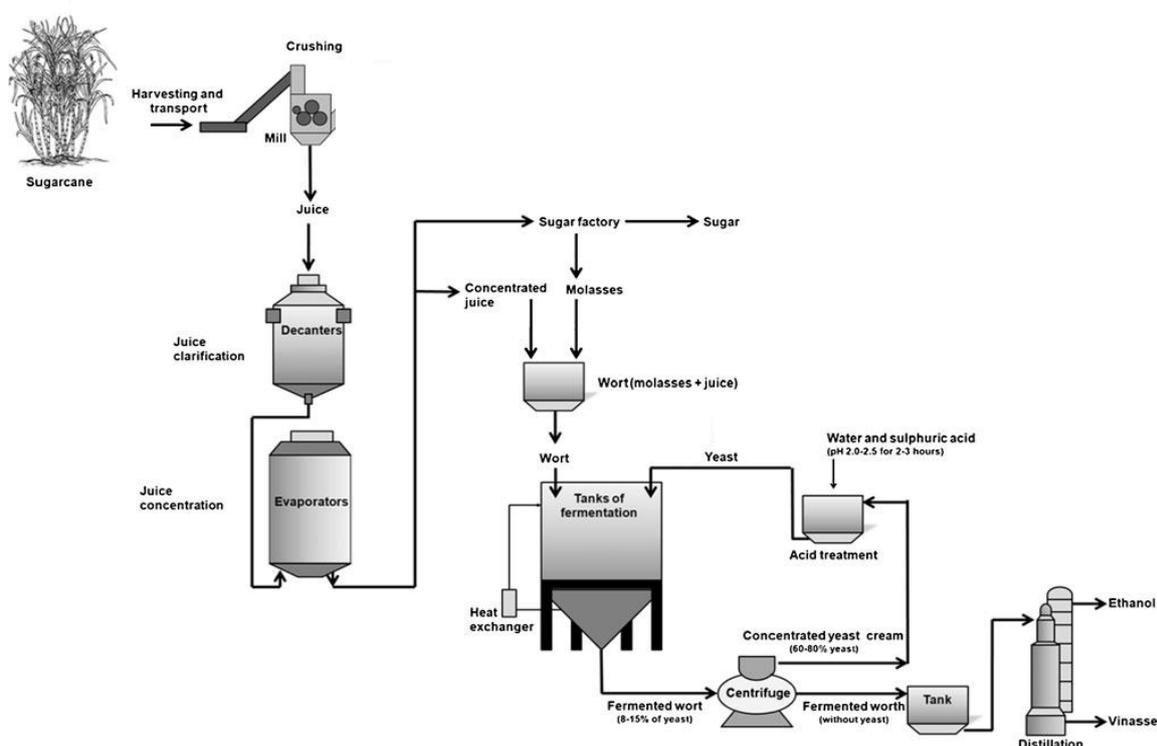


Figura 2. Ilustración simplificada de la producción de bioetanol (Modificado de Amorim *et al.*, 2011).

En nuestro país, en el año 2005 ALUR S.A. (Alcoholes del Uruguay S.A.), para seguir con las tendencias ambientales internacionales retomó la idea del proyecto Sucroalcoholero en Bella Unión inaugurándose al siguiente año la primera zafra azucarera. A su vez, en el año 2007 se aprobó la Ley N° 18.195 que promueve la producción de agrocombustibles y establece que a partir de ese año ANCAP debe incorporar etanol carburante (producido en Uruguay y con materia prima de la producción agropecuaria nacional), a las gasolinas para uso automotriz que se comercialicen en el mercado interno, en una proporción de hasta el 5% sobre el volumen total de la mezcla entre dicho producto y las naftas (ALUR, 2012).

Hoy en día la principal fuente para la producción de bioetanol en nuestro país es la caña de azúcar que se cultiva exclusivamente en el departamento de Artigas. Actualmente son 307 los productores que explotan este rubro en un área total de cosecha estimada de 6644 hectáreas, con una producción probable de 380.000 toneladas (Errea y Méndez, 2011). De esta manera, el bioetanol y sus derivados, están tomando importancia en el país.

4. Utilización de vinaza para fertirriego y sus efectos sobre los microorganismos del suelo

La vinaza es potencialmente utilizable como fertilizante agrícola ya que proviene de un producto natural sometido a un proceso en el que no intervienen productos nocivos para el suelo.

La opción de usar la vinaza como fertilizante es una alternativa al tratamiento de la misma y que, a su vez, evita que se convierta en un contaminante ambiental. Debido a que su origen es la caña de azúcar, la composición de la vinaza consta principalmente de materiales orgánicos y compuestos minerales que forman parte de compuestos y constituyentes vegetales como ser aminoácidos, proteínas, lípidos, azúcares, ácidos nucleicos, ligninas y hormonas entre otros. Por esta razón, sería lógico pensar que el destino final de la misma sea su regreso al suelo debido a que la naturaleza de forma normal tiene la capacidad de descomponer dichos materiales en procesos microbiológicos y de reciclar los elementos minerales (García y Rojas, 2008). Si se utilizara como fertilizante, la actividad microbiológica que existe en el suelo actuaría transformando la vinaza y también ésta podría afectar a los microorganismos que se encuentran allí.

La preocupación creciente por la preservación del ambiente lleva a aumentar las restricciones en el vertido de residuos de procesos industriales sin ningún tipo de tratamiento. Como alternativa se ha buscado el reciclado de los residuos como materia prima en otros procesos. Un ejemplo de esto es el uso de la vinaza en la generación de metano o en fertirriego. Diferentes autores coinciden que la composición de la vinaza la hacen potencialmente utilizable como fertilizante por su alto contenido en materia orgánica, potasio, calcio, nitrógeno y valores de pH de 4 a 5 (Sanomiya *et al.*, 2006; Korndörfer, 2007; Machado Jr., 2007; Valdes, 2007; Hernández *et al.*, 2008, Montenegro 2008; Perera *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2000). Sin embargo algunos cuidados deben tomarse antes de su uso en fertirriego dado los cambios que se han detectado en los suelos y en el ambiente.

La utilización de vinaza para riego en cultivos de caña de azúcar puede sustituir el uso de fertilizantes minerales siempre y cuando ésta no sea aplicada en exceso, ya que si se aplican dosis muy elevadas el rendimiento del cultivo puede disminuir y la salinidad de los suelos puede incrementarse. Para recomendar la dosis a utilizar debe tenerse en cuenta la composición de la vinaza pues es bastante variable y depende de ciertos factores como ser la naturaleza y composición de la materia prima usada en la producción de bioetanol, la composición del mosto, el tipo de fermentación y el proceso de destilación utilizado (de Oliveira *et al.*, 2009).

El uso de la vinaza y su aplicación en los suelos depende de varios factores entre los que se encuentra el nivel de fertilidad de los suelos, el contenido de K disponible en el suelo, la textura del suelo, el sistema de fertirriego que se utiliza, el potencial de extracción de potasio de la caña de azúcar y la composición de la vinaza (Korndörfer *et al.*, 2010). El riego con vinaza es una práctica bastante difundida en regiones de cultivo de caña de azúcar en Brasil; se han obtenido resultados satisfactorios en relación a las alteraciones químicas del suelo, al aumento de la materia orgánica, con respecto al pH y a los niveles intercambiables de calcio, magnesio y potasio. Si se aplica adecuadamente, cerca de 150 m³/ha de vinaza equivalen a una fertilización de 61 Kg/ha de nitrógeno, 343 Kg/ha de potasio y 108 Kg/ha de calcio (Bebé *et al.*, 2009).

Estudios realizados en Cuba muestran que un riego en exceso con vinaza puede afectar el balance nutricional de las plantas dado su alto contenido de potasio, sugiriendo diferentes dosis de riego en función del tipo de arcilla dominante en los suelos, recomendando 100 m³/ha en suelos con caolinita y 50 m³/ha en suelos con esmectitas (Valdes, 2007). Perera *et al.*, (2008) indicaron que para Argentina los valores máximos recomendados son de 150 m³/ha. Machado Jr. (2007) sugirió que la aplicación de vinaza produce un efecto agregador en el suelo por parte de los microorganismos, debido al alto contenido de materia orgánica y de calcio. Si el fertirriego es excesivo, puede aumentarse el contenido de sodio intercambiable y generar una menor tolerancia del suelo a las sequías. También se ha registrado un aumento del contenido de potasio en profundidad luego de la aplicación sucesiva de vinaza. Actualmente el 100% de la vinaza producida en Brasil es usada para fertirriego (Korndörfer, 2007), verificándose un aumento de la actividad microbiana debido al elevado aporte de materia orgánica.

Por ser la degradación del suelo una de las mayores preocupaciones ambientales, la aplicación de materiales de alto contenido orgánico como la vinaza se ha convertido en una práctica utilizada para su restauración. Lopes *et al.* (1986) estudiaron los efectos residuales de la vinaza en la población de rizobios del suelo en distintos cultivos. La nodulación se vio afectada dependiendo de la especie vegetal: disminuyó en el caso del cultivo de maní, aumentó en el caso de la crotalaria, y no tuvo consecuencias para la soja. En la mayoría de los trabajos publicados, se evalúa el efecto de la utilización de vinaza analizando el impacto sobre la biomasa microbiana y la productividad. En general se ha reportado que el agregado de vinaza provoca un aumento de la biomasa y de la actividad microbiana (Sanomiya *et al.*, 2006; Passarin *et al.*, 2007, Montenegro, 2008), sin alterar la calidad de la caña producida (Co Júnior *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

1) General

Evaluar los cambios de la comunidad microbiana del suelo tratado con vinaza.

2) Específicos

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

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

2.3) Determinar el efecto de la vinaza sobre la estructura de la comunidad bacteriana.

HIPÓTESIS

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

ESTRATEGIA

Se tomaron muestras de suelo en dos sitios con suelos diferentes: L1 (pradera parda) y B1 (litosoles, regosoles), antes y después de la aplicación de vinaza, donde posteriormente se cultivó caña de azúcar. Cada sitio se dividió en cuatro parcelas que recibieron aplicaciones de vinaza en tres concentraciones diferentes ($450 \text{ m}^3/\text{ha}$, $300 \text{ m}^3/\text{ha}$ y $150 \text{ m}^3/\text{ha}$). Como control se usó una parcela a la que no se le aplicó vinaza.

Para caracterizar las comunidades bacterianas se utilizaron y compararon métodos clásicos (bioquímicos) y moleculares. Las técnicas bioquímicas son rápidas, baratas y pueden proveer información sobre el componente activo heterótrofo de la población. En este trabajo se midió la actividad microbiana mediante respirometría (Sparling y West, 1990), se utilizó el método del número más probable para la determinación de bacterias nitrificantes (nitritantes y nitratantes), desnitrificantes y amonificantes (Seeley *et al.*, 1991), se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias de bacterias heterótrofas totales (Smit *et al.*, 2001) y de actinobacterias (Leoni y Ghini, 2003).

Estas técnicas bioquímicas poseen una limitación importante que es la incapacidad para estudiar un gran número de bacterias puesto que la mayoría de las mismas no son cultivables en condiciones de laboratorio (Kirk *et al.*, 2004; Kuske *et al.*, 2002). Para superar este problema se han desarrollado métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos los cuales proporcionan una imagen más amplia de las comunidades microbianas del suelo. En este trabajo se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (*Real Time* PCR) para cuantificar la población bacteriana existente en los suelos estudiados (tanto cultivables como no cultivables), analizando el gen que codifica para el ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S) (Yergeau *et al.*, 2007). El estudio de la comunidad bacteriana se completó llevando a cabo el análisis de su estructura mediante PCR-DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante) (Muyzer *et al.*, 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sitios de muestreo

Los sitios elegidos para llevar a cabo los ensayos se encuentran en predios de productores de caña de azúcar del Ingenio Alfredo Mones Quintela de Alcoholes del Uruguay S.A. (ALUR), ubicados en las cercanías de la destilería de ALUR (Bella Unión), coordenadas UTM: x- 324 a 332 Km. e y – 8642 a 8644 Km y a 55 m sobre el nivel del mar (Figura 3).



Figura 3. Mapa del Departamento de Artigas. Se representa con un punto rojo la ciudad de Bella Unión (Izquierda). Vista satelital de ALUR y ubicación de los sitios estudiados (Derecha).

Se seleccionaron dos sitios con diferentes tipos de suelos representativos de la zona por su amplia distribución (Tablas 1 y 2), donde se cultivó caña de azúcar de la variedad LCP85-384. El sitio 1 denominado “Chentomo” (Colonia España) está caracterizado como L1 (pradera parda a negra) cuyos suelos son profundos, de textura media, con un horizonte Bt muy desarrollado, drenaje moderado y fertilidad media. El sitio 2 llamado “Placeres” está caracterizado como B1 (litosoles, regosoles), con suelos superficiales a muy superficiales, negros y rojos, texturas medias y pesadas, buen drenaje y alta fertilidad. Los suelos característicos del sitio 1 comprenden un área de 1473 ha y los del sitio 2 un área de 1093 ha destinadas al cultivo de caña de azúcar en ALUR – Bella Unión.

Tabla 1. Características granulométricas del horizonte superficial del suelo en los sitios 1 y 2.

	Profundidad	Clasificación (SI)	Textura		
			Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)
Sitio 1	0-20 cm	Franco Arcillo Arenoso	66,3	13,4	20,3
Sitio 2	0-35 cm	Franco Arcilloso	43,7	22,1	33,9

SI: Sistema Internacional

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del suelo en el horizonte superficial de los sitios 1 y 2.

	% MO	CIC pH7 cmol _c /kg	Ca cmol _c /kg	Mg cmol _c /kg	K cmol _c /kg	Na cmol _c /kg	A.Tit. cmol _c /kg	% Sat Bases
Sitio 1	1,60	12,8	8,189	1,503	0,15	0,062	2,8728	77,5
Sitio 2	3,89	29,6	18,7	5,7	0,10	0,18	4,9	83,3

CIC: capacidad de intercambio catiónico; **A.Tit.:** acidez titulable; **% Sat Bases:** % de saturación de Bases (cmol_c/kg es la unidad de medida de la CIC en el SI sustituyendo a meq/100g)

Cada sitio se dividió en cuatro parcelas (Figuras 4 y 5) que recibieron aplicaciones de vinaza (Tabla 3), antes que se realizara la siembra de la caña, en tres concentraciones diferentes (450 m³/ha, 300 m³/ha y 150 m³/ha); a una de las parcelas no se le aplicó vinaza y se la utilizó como parcela control. Las muestras de suelo fueron tomadas antes y después de la aplicación de vinaza.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de la vinaza aplicada.

	DQO (mg O ₂ /L)	K (mg/l)	Na (mg/l)	Ca (mg/l)
Sitio 1	19650 (+/- 2392)	2225,6	60,5	795,1
Sitio 2	27410 (+/- 5179)	2648,5	77,5	926,9

A los 9 meses de la aplicación directa de vinaza se realizó un riego en el sitio 1 con vinaza diluida 30 veces (1:30, vinaza:agua equivalente a una dosis aproximada de 150 m³/ha). En este riego por canales no se tuvo en cuenta la parcela control que también recibió vinaza, por lo que las muestras de este sitio tomadas a los 13 meses no se pudieron comparar con un control como se hizo en los muestreos anteriores. En el sitio 2 se mantuvieron las condiciones planificadas desde el comienzo de la investigación.

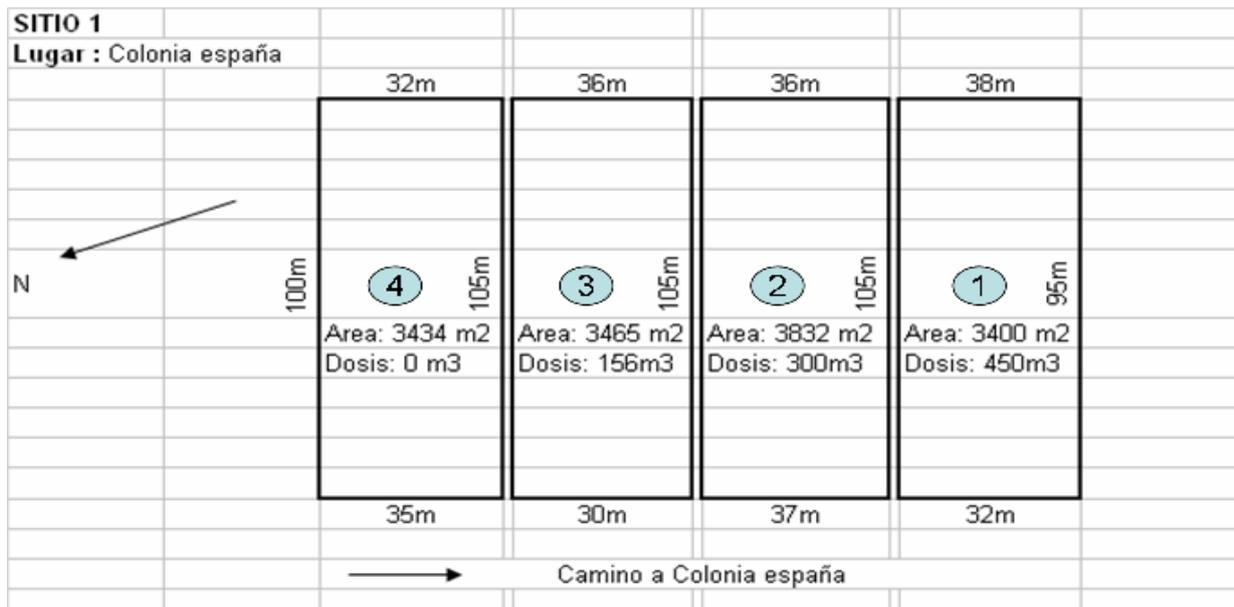


Figura 4. Esquema del diseño experimental del sitio 1.

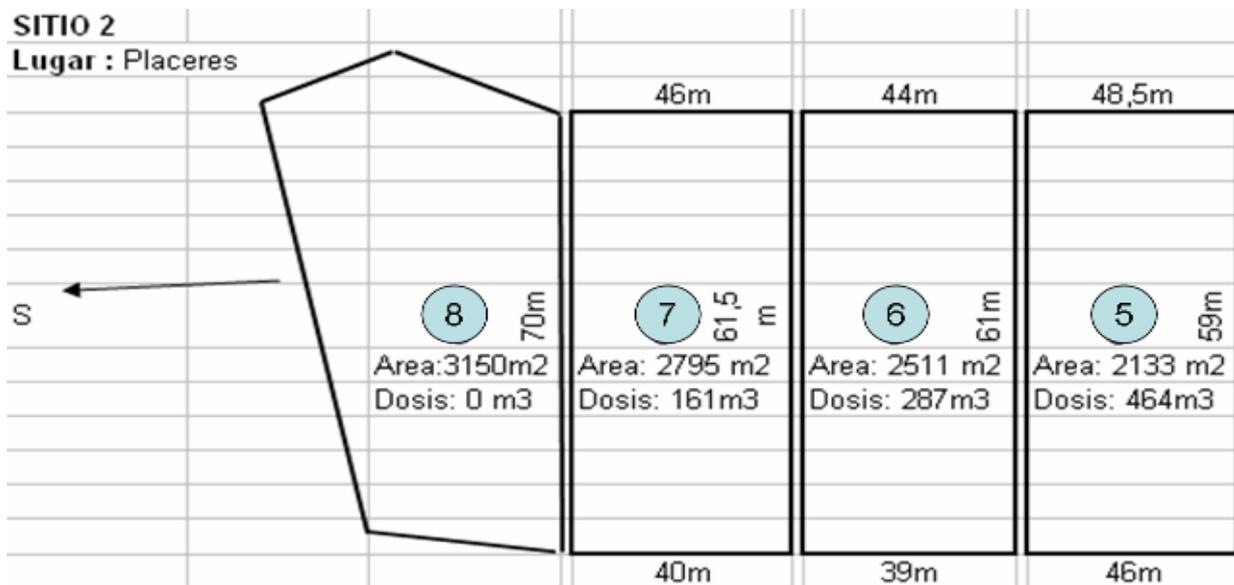


Figura 5. Esquema del diseño experimental del sitio 2.

2. Obtención de muestras de suelo

Los muestreos se realizaron antes de la aplicación de vinaza (tiempo 0), a los 15 días, al mes, a los 5, 8 y 13 meses aproximadamente después de la aplicación de la misma (Tabla 4). Se tomaron 3 muestras de suelo en cada parcela, cada una compuesta por 10 tomas de suelo al azar, con un calador de 2 cm diámetro y de 0 a 10 cm de profundidad, a partir de la base del camellón (Figura 6). Las muestras se secaron al aire a 20°C, en caso de ser necesario, y se tamizaron por malla de 2 mm para su homogenización. Se conservaron a 4°C y -80°C hasta el momento de su análisis.



Figura 6. Sitios en donde se realizaron los muestreos. Sitio 1 (izquierda), sitio 2 (derecha).

3. Determinación de humedad

Se determinó el porcentaje de humedad de cada muestra secando 10 g de suelo en estufa a 100°C durante 48 h, para expresar los resultados en función de gramos de suelo seco.

Tabla 4. Cronograma del ensayo. Se presentan los tiempos en que se realizaron los muestreos, la siembra y el tapado de la caña en cada parcela, respecto a la fecha de aplicación de vinaza.

	TRATAMIENTO	MUESTREO INICIAL	APLICACIÓN	SIEMBRA	MUESTREO 1	TAPADO	MUESTREO 2	MUESTREO 3	MUESTREO 4	RIEGO	MUESTREO 5
		(TIEMPO 0)	de VINAZA		(15 DÍAS)		(1 MES)	(5 MESES)	(8 MESES)	con VINAZA	(13 MESES)
	Dosis de vinaza	Tiempo antes de la aplicación		Tiempo después de la aplicación de vinaza							
PARCELA 1	450 m ³ /ha	17 días	04/03/2011	17 días	18 días	28 días	33 días	5 meses y 25 días	8 meses y 10 días	9 meses	13 meses y 14 días
PARCELA 2	300 m ³ /ha	17 días	04/03/2011	17 días	18 días	28 días	33 días	5 meses y 25 días	8 meses y 10 días	9 meses	13 meses y 14 días
PARCELA 3	150 m ³ /ha	17 días	04/03/2011	17 días	18 días	18 días	33 días	5 meses y 25 días	8 meses y 10 días	9 meses	13 meses y 14 días
PARCELA 4	0 (Control)	17 días	04/03/2011	17 días	18 días	18 días	33 días	5 meses y 25 días	8 meses y 10 días	9 meses	13 meses y 14 días
	Dosis de vinaza	Tiempo antes de la aplicación		Tiempo después de la aplicación de vinaza							
PARCELA 5	450 m ³ /ha	35 días	23/03/2011	34 días	14 días	41 días	50 días	5 meses y 6 días	7 meses y 21 días	nc	12 meses y 25 días
PARCELA 6	300 m ³ /ha	35 días	23/03/2011	34 días	14 días	41 días	50 días	5 meses y 6 días	7 meses y 21 días	nc	12 meses y 25 días
PARCELA 7	150 m ³ /ha	35 días	23/03/2011	34 días	14 días	41 días	50 días	5 meses y 6 días	7 meses y 21 días	nc	12 meses y 25 días
PARCELA 8	0 (Control)	35 días	23/03/2011	34 días	14 días	41 días	50 días	5 meses y 6 días	7 meses y 21 días	nc	12 meses y 25 días

nc: no corresponde

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

En todas las muestras (conservadas a 4°C por un máximo de 2 meses) se determinó el número de bacterias viables pertenecientes a diferentes grupos. Para esto se suspendieron 5 g de suelo en 45 mL de pirofosfato de sodio 0.1% (p/v) estéril y se agitó a 150 rpm durante 30 min. Se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en placa, por triplicado (en gota) para heterótrofos aerobios y por duplicado (en superficie) para actinobacterias. Para los ensayos de NMP de bacterias del ciclo de nitrógeno se inocularon tubos con 3 diluciones, por triplicado. Las diluciones utilizadas para el recuento de heterótrofos aerobios fueron 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , mientras que para las actinobacterias se usaron las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} . Para las bacterias del ciclo del nitrógeno las diluciones usadas fueron las siguientes:

- Bacterias amonificantes: 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}
 - Bacterias nitrificantes (nitritantes y nitratantes): 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2}
 - Bacterias desnitrificantes: 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}
- Para los ensayos de recuento en placas se utilizaron los siguientes medios:
 - Heterótrofos aerobios: medio Tryptic Soy Agar 1/10 Difco® (TSA 1/10) suplementado con cicloheximida 100 µg/ml (Smit *et al.*, 2001) (Anexo).
 - Actinobacterias: medio Starch Casein Agar (SCA) suplementado con cicloheximida 100 µg/ml (Leoni y Ghini, 2003) (Anexo).
 - Para los ensayos de NMP de bacterias del ciclo del nitrógeno se usaron los siguientes medios:
 - Amonificantes: medio con peptona 4% (Seeley *et al.*, 1991) (Anexo).
 - Nitrificantes (nitritantes): medio con amonio como fuente de N (Seeley *et al.*, 1991) (Anexo).
 - Nitrificantes (nitratantes): medio con nitrito como fuente de N (Seeley *et al.*, 1991) (Anexo).
 - Desnitrificantes: medio caldo nitrato con campana de Durham (Seeley *et al.*, 1991) (Anexo).

Las placas y los tubos se incubaron a 25°C; los tubos se agitaron a 150 rpm excepto para el ensayo de bacterias desnitrificantes que se incubaron sin agitación. A los 7 días se determinó el número de colonias totales (heterótrofos) y de colonias típicas de actinobacterias. Los tubos para la detección de bacterias amonificantes se revelaron a las 48 h con el reactivo de Nessler (Seeley *et al.*, 1991) (Anexo). A los 7 días se cuantificaron los demás grupos por detección de nitritos y nitratos en el medio de cultivo, utilizando tiras reactivas QUANTOFIX® Nitrato/Nitrito (Macherey-Nagel).

En el caso de las bacterias desnitrificantes, se verificó también la formación de una burbuja en la campana, indicativa de la liberación de gases.

5. Medida de actividad microbiana por respirometría

En frascos herméticamente cerrados, se incubaron 25 g de suelo a 25°C por 48 h, previo ajuste de la humedad al 75% de la capacidad de campo:

$$m_{\text{agua agregar}} = \frac{m_{\text{muestra húmeda}} \times (0,75 \times \text{CC} - \text{H}\%) }{(1 + \text{\%H})}$$

CC: Capacidad de campo

H%: Porcentaje de humedad

La concentración de CO₂ se determinó por cromatografía de gases, a partir de un volumen de inyección de 1 mL. Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC14B con detector de conductividad térmica (TCD) y una columna Alltech CTR I (columna concéntrica de 6 pies de largo, con la columna exterior de 6' x 1/4" de tamices moleculares activados, y la columna interior de 6' x 1/8" de una mezcla porosa de polímeros). El detector operó a 60°C y 120 mA, la temperatura de la columna fue 60°C, y el gas carrier He a 40 mL/min. Como estándar se usó una mezcla gaseosa que contenía CO₂ 2,7% (v/v) (Sparling y West, 1990).

6. Extracción de ADN

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

7. PCR (Polymerase Chain Reaction)

A partir del ADN genómico se amplificó un fragmento del gen del ARNr 16S utilizando cebadores universales para el dominio *Bacteria* F968 - GC y R1378, con un extremo rico en GC en el cebador 5' - 3' (Heuer *et al.*, 1997) (Anexo). Las condiciones de la reacción de PCR se ajustaron a partir de las utilizadas previamente por otros autores (Peixoto *et al.*, 2002).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl conteniendo 1X de buffer de reacción, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM de cada cebador, 0,1 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA), formamida 1/100, 2,5 u de Taq polimerasa, 1 µl de una dilución adecuada de

cada muestra para igualar la cantidad de ADN genómico en todas las reacciones y cantidad necesaria de agua bidestilada.

Para la reacción de PCR se utilizó el siguiente programa: temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 2 min; un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 1 min, un ciclo de hibridación a 55°C durante 1 min y un ciclo de extensión a 72°C durante 2 min. Los ciclos se repitieron 35 veces y se llevó a cabo una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron en primera instancia en geles de agarosa 1% (p/v) en TAE 1X (100 V, 45 min), y luego por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

8. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Los productos de PCR se analizaron por DGGE en un equipo C.B.S. Scientific, en buffer TAE (Tris-acetato, EDTA; pH 7.5) 1X a 60°C. Los geles de poliacrilamida contenían un 6% de acrilamida y un gradiente de agentes desnaturalizantes de 40-65% (100% de agentes desnaturalizantes: urea 7M y formamida 40% (v/v), previamente desionizada con la resina AG® 501-X8 de Bio-Rad) (Anexo); la corrida electroforética se llevó a cabo a 70 V durante 16 h (Peixoto *et al.*, 2002). El marcador de peso molecular usado fue el Gene Ruler 1Kb plus DNA Ladder (de 75 a 20000 pares de bases) de Thermo Scientific. Los geles se revelaron con SYBR green durante 1 h y se visualizaron bajo luz UV utilizando el Multi-purpose image scanner Fuji Film Fla-9000.

9. Real Time PCR (rt-PCR)

Para determinar el número de bacterias totales presentes en las muestras de suelo se cuantificó el número de copias del gen del ARNr 16S mediante la técnica de Real Time PCR utilizando el kit comercial Rotor Gene SYBR green PCR (QIAGEN) y un equipo Rotor-Gene 6000 (marca Corbett). Las curvas de calibración se realizaron a partir de ADN genómico purificado, extraído con un método convencional de extracción de ADN (Sambrook *et al.*, 1987) de una cepa de *Pseudomonas fluorescens*. Para las curvas de calibración se utilizaron tres concentraciones (1,5 ng/μl, 0,15 ng/μl y 0,015 ng/μl) del ADN genómico de dicha cepa y cada punto de la curva se realizó por triplicado. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 12,5 μl utilizando el SBYR Green PCR Master Mix 1X, conteniendo 1μM de cada cebador específico Ba519f y Ba907r (Anexo) para el dominio *Bacteria*, que se utilizaron en las condiciones reportadas por Lueders *et al.* (2004) con 2,5 μl de ADN extraído de suelo con la dilución adecuada, de forma tal que la concentración del mismo quede comprendido en el rango de concentraciones utilizado para la curva de calibración. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

Las condiciones de ciclado consistieron en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C durante 10 seg, una etapa de hibridación a 52°C durante 10 seg y una etapa de extensión a 72°C durante 20 seg.

10. Análisis de datos

10.1. Corrección del porcentaje de humedad del suelo

En todos los casos el porcentaje de humedad (H%) y el factor de corrección de la humedad (h) se calcularon a partir de las siguientes fórmulas:

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

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

PF: Peso Fresco

PS: Peso Seco

10.2. Recuentos bacterianos y NMP

Los datos obtenidos de los recuentos en placa y de los ensayos de NMP fueron convertidos según el porcentaje de humedad de cada muestra para poder expresarse como unidades formadoras de colonias (UFC)/ g suelo seco y como NMP/ g suelo seco respectivamente, según la siguiente fórmula (Frioni, 2006):

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

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

10.3. Real Time PCR

A partir de los datos obtenidos mediante las reacciones de PCR en tiempo real, se calculó para cada muestra, el número de copias del gen del ARNr 16S por gramo de suelo fresco a partir del número de copias del gen del ARNr 16S de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* utilizada como estándar en la reacción; el número de copias de cada muestra se halló extrapolando a partir de la curva de calibración. El cálculo del número de copias se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de copias} = \frac{6,02 \times 10^{23} (\text{n}^{\circ} \text{ de copias/mol}) \times \text{cantidad de ADN (g)}}{\text{largo del fragmento de ADN} \times 660 (\text{g/mol/pb})}$$

donde el número de Avogadro que es $6,02 \times 10^{23}$ corresponde al número de copias por mol y el peso molecular promedio de un par de bases (pb) de ADN es 660 g/mol (Kim *et al.*, 2013).

Los valores obtenidos fueron convertidos luego según el porcentaje de humedad de cada muestra, para poder expresarlos como N° de copias/ g de suelo seco.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de copias / g suelo seco} = \text{N}^{\circ} \text{ de copias / g suelo fresco} \times h$$

10.4. Respiración microbiana

Los resultados se expresaron como mg C-CO₂/kg de suelo fresco y fueron calculados, inicialmente, a partir de un patrón de CO₂ (2,7% CO₂ v/v) y posteriormente de aire (0,04% CO₂ v/v). Del cromatograma obtenido para cada muestra, se integró el pico correspondiente al CO₂, se restó el área del blanco (frasco herméticamente cerrado sin muestra de suelo), y considerando el área resultante del cromatograma del patrón de calibración, se calculó el volumen de CO₂ producido por la muestra. Asumiendo el CO₂ como gas ideal, y de acuerdo con la masa de muestra utilizada se calcularon los mg C-CO₂/kg de suelo fresco. Por último se ajustaron los valores según el porcentaje de humedad de cada muestra para poder expresar los datos por kg de suelo seco.

$$\text{mg C-CO}_2 / \text{kg suelo seco} = \text{mg C-CO}_2 / \text{kg suelo fresco} \times h$$

10.5. Análisis estadísticos

Los valores de los recuentos bacterianos, de NMP, de *Real Time* PCR (transformados a log₁₀) y los de respiración microbiana fueron analizados utilizando el programa Statistica 5.0. Se examinó la normalidad de los datos por el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett. En los casos donde la distribución de los datos fue normal y las varianzas homogéneas, se evaluaron en cada tiempo y para cada variable (abundancia de los grupos de bacterias y respiración) las diferencias entre los tratamientos mediante ANOVA de una vía (con tratamiento como factor) y el test de Tukey's HSD (Honestly Significant Difference). De lo contrario, se realizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Mann-Whitney.

10.6. DGGE

El análisis de los perfiles de bandas de ADN se realizó mediante el programa Gel Compar II Versión 6.5 de Applied Maths (<http://www.applied-maths.com/gelcompar-ii>). Se utilizó el coeficiente de Dice para determinar la distancia métrica y el algoritmo UPGMA para construir los dendogramas.

RESULTADOS

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

El estudio de la comunidad bacteriana cultivable se llevó a cabo utilizando la técnica de recuento en placa para las poblaciones de bacterias heterótrofas y de actinobacterias, mientras que para estudiar la abundancia de las bacterias del ciclo del nitrógeno se utilizó la técnica del número más probable (NMP) (Figura 7). Para los recuentos en placa de heterótrofos y actinobacterias se trabajó con todas las muestras de suelo, mientras que para los ensayos de NMP no se analizaron las muestras de suelo que recibieron la dosis de vinaza de 300 m³/ha. El número de bacterias por gramo de suelo seco determinado para cada grupo en ambos tipos de suelos, con y sin vinaza, se encontró siempre en el mismo rango, observándose valores de 10⁷-10⁸ para heterótrofos, 10⁶-10⁷ para actinobacterias, bacterias amonificantes y bacterias desnitrificantes. En el caso de las bacterias nitrificantes (nitritantes y nitratantes) la abundancia encontrada fue menor que la hallada para los demás grupos bacterianos. En el caso de las bacterias nitritantes se hallaron valores de 10² en ambos sitios en todos los momentos de muestreo, tanto para las parcelas regadas con distintas dosis de vinaza como para la parcela control. Con respecto a las bacterias nitratantes, en el sitio 1, se verificaron valores de 10² en las muestras tomadas antes de aplicar vinaza y valores entre 10¹-10² en muestras tomadas luego de la aplicación de la misma. En el sitio 2, para este grupo bacteriano se constataron valores entre 10¹ y 10² de bacterias por gramo de suelo seco, tanto en las parcelas con diferentes tratamientos de vinaza como en la parcela control. Este comportamiento se observó en todos los momentos de muestreo y para todas las parcelas exceptuando los datos obtenidos a partir de las muestras tomadas 5 meses después de la aplicación de vinaza que mostraron un leve aumento de esta población bacteriana con valores registrados entre 10²-10³.

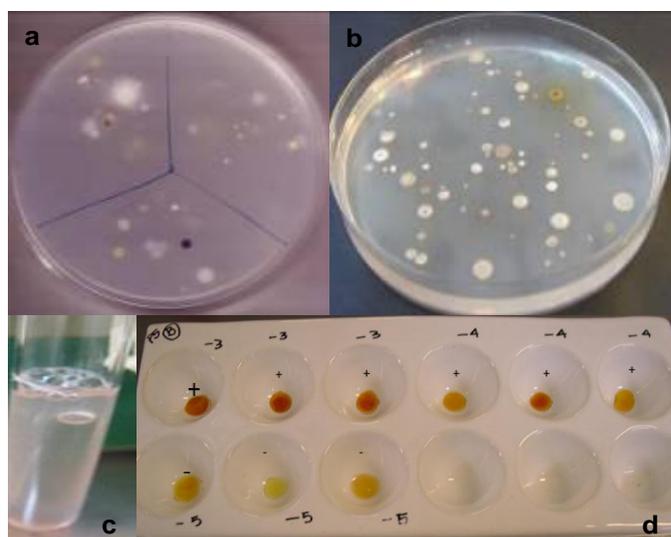


Figura 7. Visualización de los resultados de algunos ensayos utilizados para estudiar bacterias cultivables: **a)** Placa con bacterias heterótrofas, **b)** Placa con actinobacterias, **c)** Tubo con campana de Durham y burbuja indicativa de presencia de bacterias desnitrificantes, **d)** Revelado con reactivo de Nessler para detectar la presencia de bacterias amonificantes: el color naranja indica presencia de amonio y el amarillo ausencia del

En el sitio 1, a los 18 días luego de la aplicación de vinaza, la cantidad de bacterias heterótrofas aumentó en las tres parcelas que recibieron vinaza respecto a la parcela control; en las parcelas donde se aplicaron las dosis de 450 m³/ha y 300 m³/ha el aumento observado fue de alrededor de 5 veces, mientras que en la parcela que recibió 150 m³/ha el aumento fue de 3 veces. La abundancia de este grupo bacteriano a los 5 meses luego del riego permaneció mayor (4 a 5 veces) en las tres parcelas que recibieron vinaza con respecto a la parcela control. Luego de 8 y 13 meses de aplicada la vinaza, la cantidad de estas bacterias fue igual en las parcelas tratadas con vinaza que en la parcela control (Tabla 5; Figura 8).

La cantidad de actinobacterias del sitio 1, a los 18 días del riego, aumentó significativamente en las parcelas que recibieron vinaza respecto a la parcela control, siendo 10 veces mayor en la parcela que recibió la dosis más alta (450 m³/ha) y 3 a 4 veces mayor en las otras parcelas. En los siguientes muestreos (33 días, 5 y 8 meses luego del riego), la abundancia de actinobacterias continuó siendo mayor en las parcelas que recibieron vinaza respecto al control (entre 2 y 5 veces), mientras que a los 13 meses luego de la aplicación la cantidad de estas bacterias fue la misma tanto en las parcelas tratadas como en la parcela control (Tabla 6; Figura 9).

Tabla 5. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.

Bacterias heterótrofas (UFC/ g suelo seco) - SITIO 1												
Tratamiento	DÍA 0		DÍA 18		DÍA 33		5 MESES		8 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	1,42 x 10 ⁸	a	2,27 x 10 ⁸	a	1,26 x 10 ⁸	a	6,36 x 10 ⁷	a	3,43 x 10 ⁷	a	2,37 x 10 ⁷	a
300 m ³ /ha	1,37 x 10 ⁷	a	2,52 x 10 ⁸	a	1,32 x 10 ⁸	a	4,73 x 10 ⁷	a	1,58 x 10 ⁷	a	3,96 x 10 ⁷	a
150 m ³ /ha	2,72 x 10 ⁷	a	1,29 x 10 ⁸	ab	2,17 x 10 ⁷	b	5,85 x 10 ⁷	a	2,82 x 10 ⁷	a	2,76 x 10 ⁷	a
0 m ³ /ha	3,49 x 10 ⁷	a	4,45 x 10 ⁷	b	4,21 x 10 ⁷	ab	1,22 x 10 ⁷	b	2,64 x 10 ⁷	a	1,77 x 10 ⁷	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

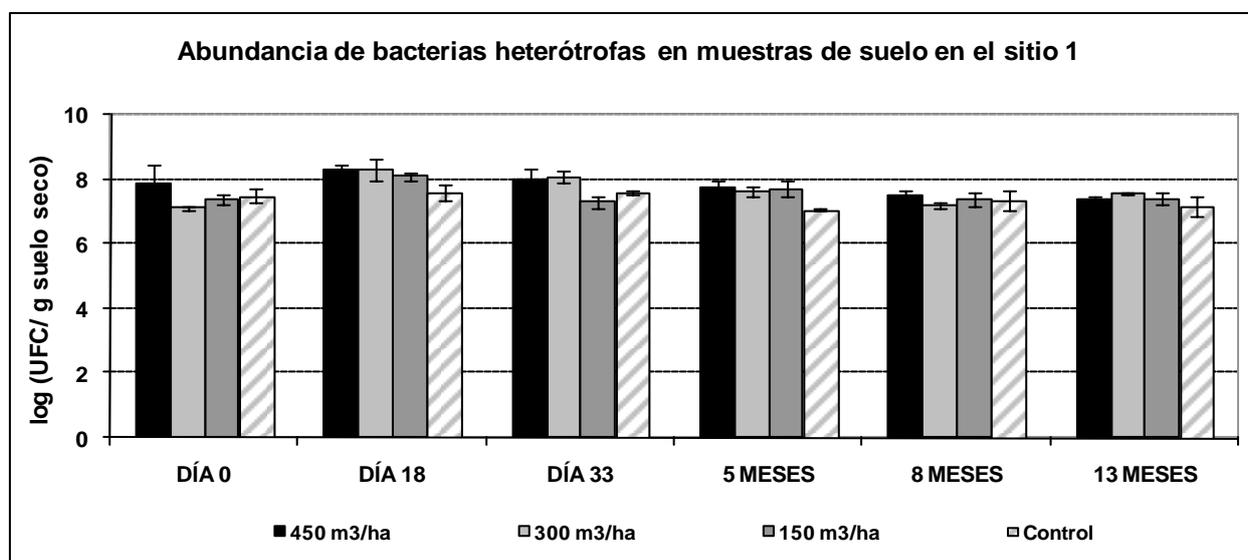


Figura 8. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo en el sitio 1.

Tabla 6. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.

Actinobacterias (UFC/ g suelo seco) - SITIO 1												
Tratamiento	DÍA 0		DÍA 18		DÍA 33		5 MESES		8 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	4,17 x 10 ⁶	a	1,14 x 10 ⁷	a	8,43 x 10 ⁶	a	8,17 x 10 ⁶	a	6,13 x 10 ⁶	a	5,87 x 10 ⁶	a
300 m ³ /ha	8,89 x 10 ⁵	b	4,62 x 10 ⁶	bc	8,87 x 10 ⁶	a	4,36 x 10 ⁶	b	6,06 x 10 ⁶	a	3,53 x 10 ⁶	a
150 m ³ /ha	2,94 x 10 ⁶	a	5,75 x 10 ⁶	ab	5,11 x 10 ⁶	b	7,94 x 10 ⁶	a	5,22 x 10 ⁶	ab	2,81 x 10 ⁶	a
0 m ³ /ha	3,81 x 10 ⁶	a	1,47 x 10 ⁶	c	4,67 x 10 ⁶	b	2,95 x 10 ⁶	b	3,18 x 10 ⁶	b	1,99 x 10 ⁶	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

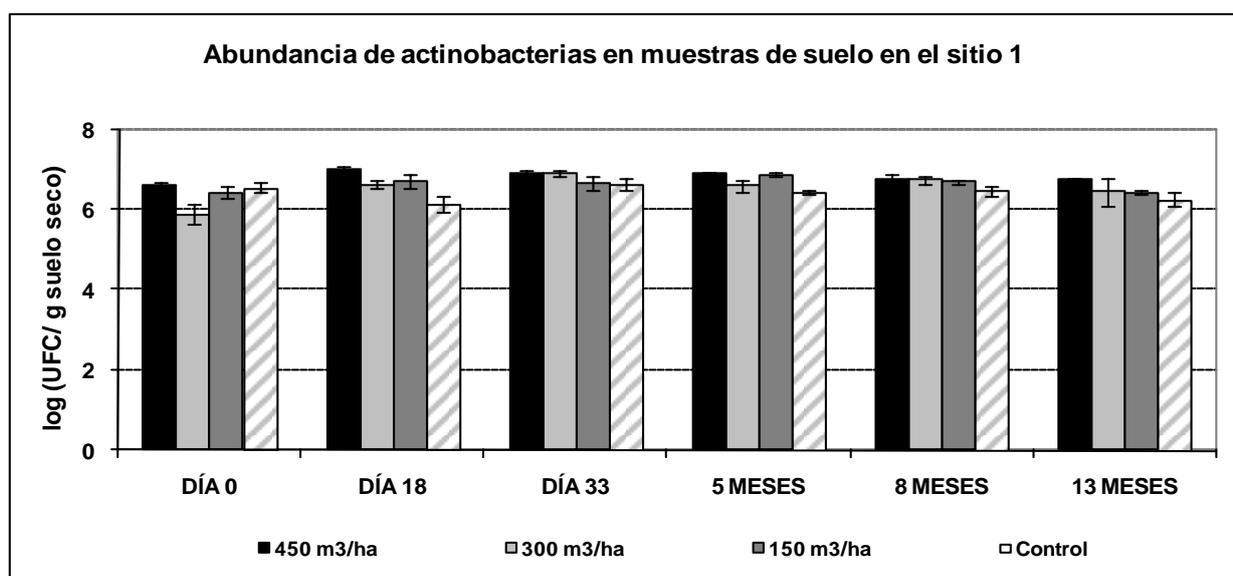


Figura 9. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo en el sitio 1.

Cuando se analizaron las muestras de suelo tomadas en las parcelas del sitio 1, a los 18 días luego del riego, las poblaciones de bacterias amonificantes no mostraron diferencias entre las parcelas que recibieron vinaza respecto a la parcela control. Sin embargo, a los 33 días la abundancia de estas bacterias tuvo un aumento significativo de un orden de magnitud en la parcela donde se aplicó la mayor dosis (450 m³/ha) de vinaza respecto a la parcela control; a los 5 meses no se constataron diferencias significativas en el número de bacterias amonificantes entre las parcelas que recibieron vinaza y la parcela control, pero a los 13 meses se volvió a observar un aumento significativo de un orden de magnitud en la parcela que recibió una aplicación de 450 m³/ha de vinaza respecto a la parcela control (Tabla 7; Figura 10).

Con respecto a la abundancia de bacterias desnitrificantes en el sitio 1 se observó un aumento significativo, aunque con una gran variabilidad, de estas poblaciones a los 18 días de aplicada la vinaza en la parcela tratada con 450 m³/ha con respecto al control. En los

muestreos posteriores (33 días, 5 y 13 meses) no se observaron diferencias en el número de estas bacterias entre las parcelas (Tabla 8; Figura 11).

La cantidad de bacterias nitrificantes (nitritantes y nitratantes), a partir de muestras tomadas en el sitio 1, no registró diferencias significativas entre las parcelas que fueron tratadas con vinaza y la parcela control, con excepción de las bacterias nitratantes que tuvieron un aumento de la población de un orden de magnitud en la parcela que recibió una dosis de vinaza de 150 m³/ha y un aumento intermedio en la parcela regada con 450 m³/ha respecto al control luego de 13 meses de aplicada la vinaza (Tablas 9 y 10; Figuras 12 y 13).

Tabla 7. Abundancia de bacterias amonificantes en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.

Bacterias amonificantes (NMP/ g suelo seco) - SITIO 1								
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 18		DÍA 33		5 MESES		13 MESES
450 m ³ /ha	2,02 x 10 ⁷	8,53 x 10 ⁶	a	5,19 x 10 ⁷	a	2,94 x 10 ⁷	a	3,49 x 10 ⁷
150 m ³ /ha	2,69 x 10 ⁷	2,77 x 10 ⁷	a	5,11 x 10 ⁶	b	2,79 x 10 ⁶	b	8,51 x 10 ⁶
0 m ³ /ha	2,35 x 10 ⁶	5,57 x 10 ⁶	a	3,24 x 10 ⁶	b	8,43 x 10 ⁶	ab	3,94 x 10 ⁶

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

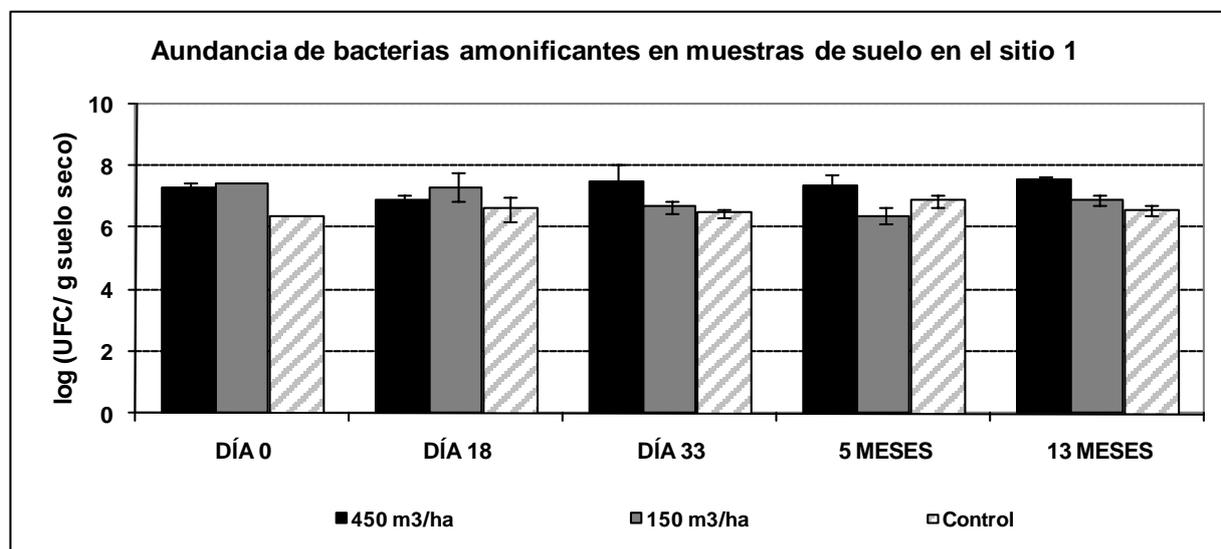


Figura 10. Abundancia de bacterias amonificantes en muestras de suelo en el sitio 1

Tabla 8. Abundancia de bacterias desnitrificantes en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza

Bacterias Desnitrificantes (NMP/ g suelo seco) - SITIO 1							
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 18		DÍA 33		5 MESES	13 MESES
450 m3/ha	$9,03 \times 10^6$	$1,23 \times 10^7$	a	$8,37 \times 10^7$	a	$3,70 \times 10^7$	$4,31 \times 10^6$
150 m3/ha	$3,25 \times 10^6$	$6,23 \times 10^7$	a	$1,57 \times 10^7$	a	$2,41 \times 10^7$	$1,39 \times 10^6$
0 m3/ha	$2,35 \times 10^6$	$1,22 \times 10^7$	b	$5,13 \times 10^6$	a	$5,30 \times 10^6$	$2,04 \times 10^6$

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

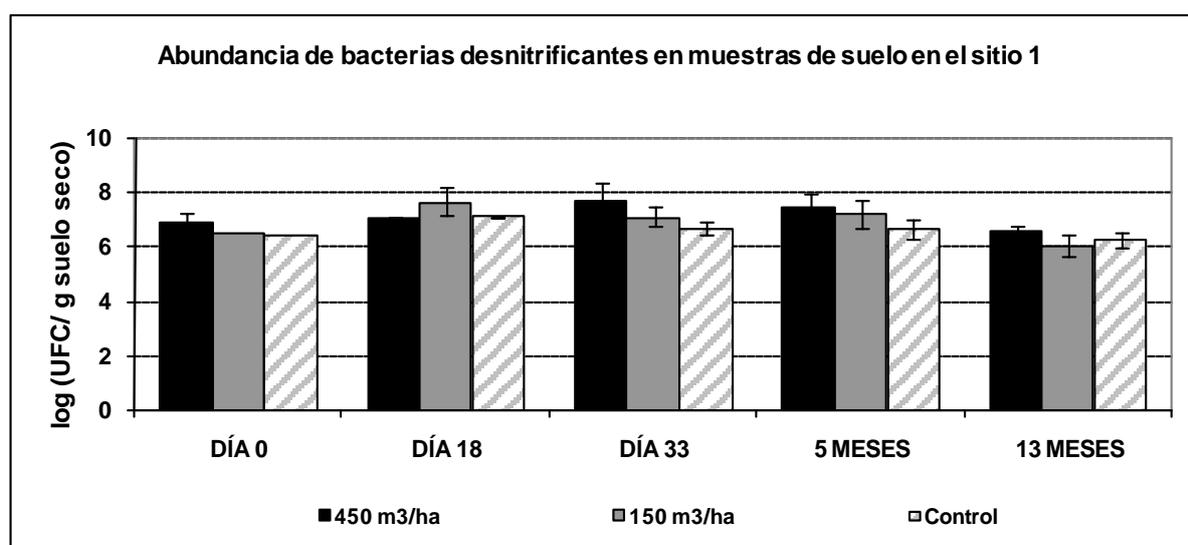


Figura 11. Abundancia de bacterias desnitrificantes en muestras de suelo en el sitio 1.

Tabla 9. Abundancia de bacterias nitrificantes en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.

Bacterias Nitrificantes (NMP/ g suelo seco) - SITIO 1							
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 18		DÍA 33		5 MESES	13 MESES
450 m3/ha	$2,05 \times 10^2$	$2,57 \times 10^2$	a	$1,04 \times 10^3$	a	$4,79 \times 10^2$	$9,96 \times 10^2$
150 m3/ha	$2,58 \times 10^2$	$1,75 \times 10^2$	a	$4,78 \times 10^2$	a	$4,05 \times 10^2$	$3,52 \times 10^2$
0 m3/ha	$1,02 \times 10^2$	$2,99 \times 10^2$	a	$5,20 \times 10^2$	a	$1,02 \times 10^2$	$6,59 \times 10^2$

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

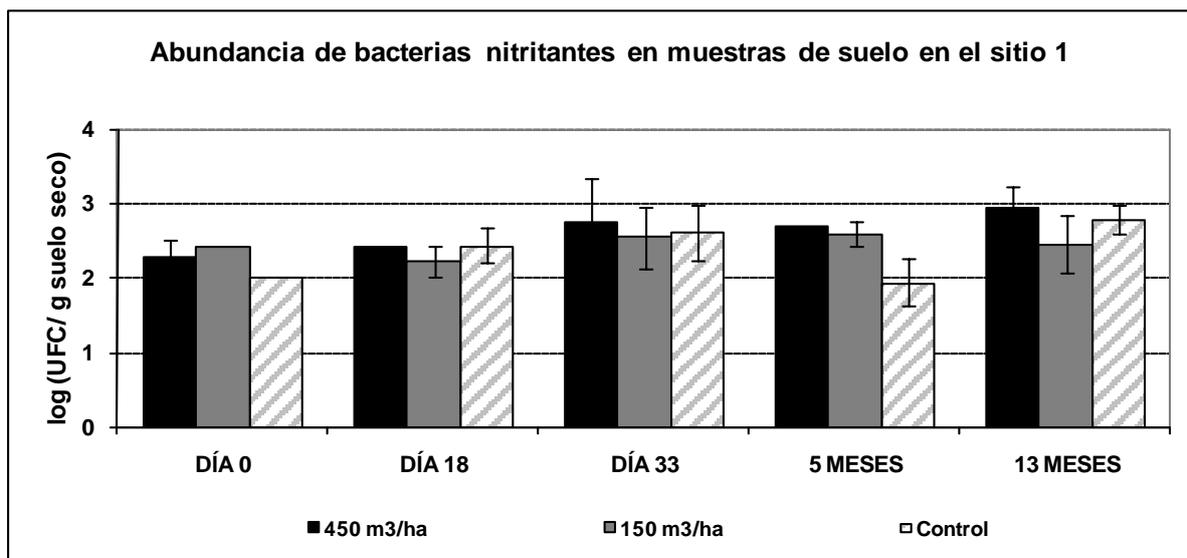


Figura 12. Abundancia de bacterias nitritantes en muestras de suelo en el sitio 1.

Tabla 10. Abundancia de bacterias nitratantes en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.

Bacterias Nitratantes (NMP/ g suelo seco) - SITIO 1							
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 18		DÍA 33		5 MESES	13 MESES
450 m3/ha	$4,43 \times 10^2$	$5,62 \times 10^1$	a	$3,31 \times 10^1$	a	$1,33 \times 10^2$	$8,50 \times 10^2$
150 m3/ha	$< 3,36 \times 10^1$	$3,80 \times 10^1$	a	$8,04 \times 10^1$	a	$2,49 \times 10^2$	$1,39 \times 10^3$
0 m3/ha	$< 3,36 \times 10^1$	$1,44 \times 10^2$	a	$1,28 \times 10^2$	a	$6,41 \times 10^2$	$1,85 \times 10^2$

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

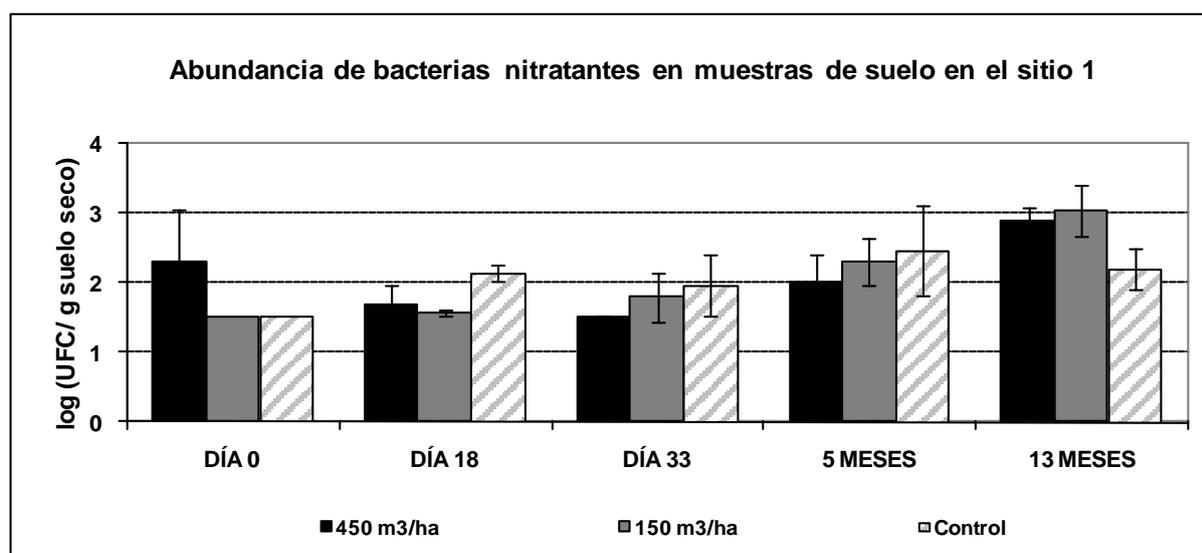


Figura 13. Abundancia de bacterias nitratantes en muestras de suelo en el sitio 1.

A partir del análisis de las muestras de suelo tomadas en el sitio 2, no se observaron diferencias significativas en la abundancia de bacterias heterótrofas ni de actinobacterias en las parcelas tratadas con vinaza con respecto a la parcela control; únicamente se registró un efecto puntual a los 8 meses luego del riego, donde la población de bacterias heterótrofas de la parcela que recibió la dosis más alta de vinaza (450 m³/ha) fue menor que la cantidad de éstas en la parcela control (Tablas 11 y 12; Figuras 14 y 15).

Tabla 11. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.

Bacterias heterótrofas (UFC/ g suelo seco) - SITIO 2												
Tratamiento	DÍA 0		DÍA 14		DÍA 50		5 MESES		8 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	4,17 x 10 ⁷	a	8,96 x 10 ⁷	a	5,65 x 10 ⁷	a	3,53 x 10 ⁷	a	2,73 x 10 ⁷	b	3,20 x 10 ⁷	a
300 m ³ /ha	3,30 x 10 ⁷	a	3,90 x 10 ⁷	a	7,37 x 10 ⁷	a	4,65 x 10 ⁷	a	4,51 x 10 ⁷	ab	1,89 x 10 ⁸	a
150 m ³ /ha	6,05 x 10 ⁷	a	6,37 x 10 ⁷	a	7,26 x 10 ⁷	a	5,07 x 10 ⁷	a	7,36 x 10 ⁷	a	3,26 x 10 ⁷	a
0 m ³ /ha	3,28 x 10 ⁷	a	6,66 x 10 ⁷	a	1,10 x 10 ⁸	a	5,54 x 10 ⁷	a	9,54 x 10 ⁷	a	2,65 x 10 ⁷	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

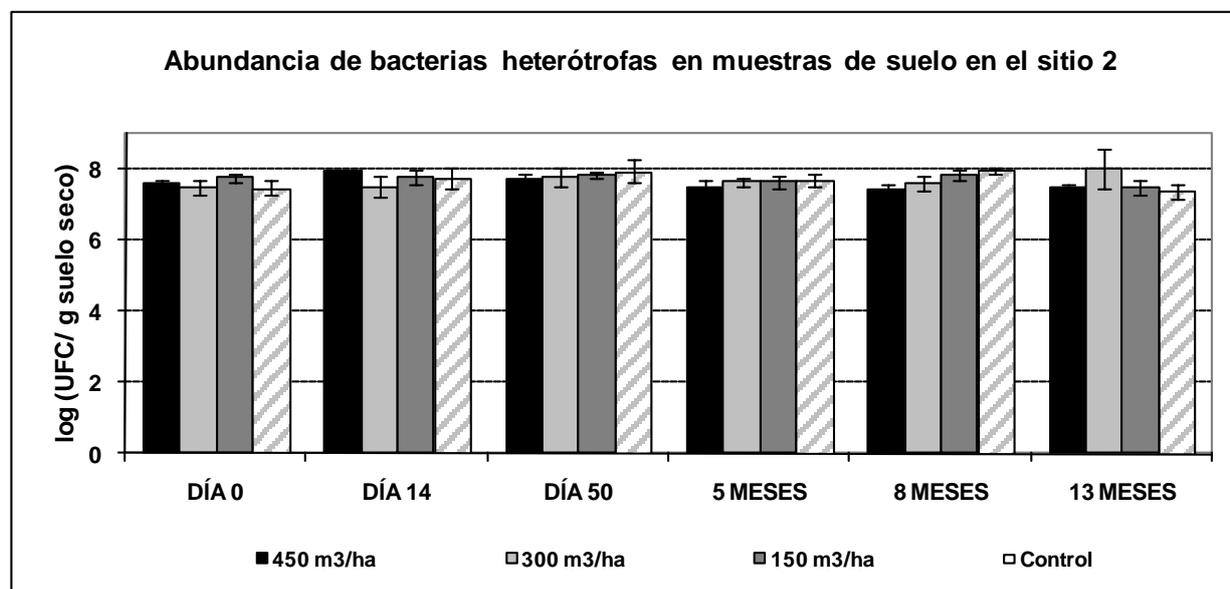


Figura 14. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo en el sitio 2.

Tabla 12. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.

Actinobacterias (UFC/ g suelo seco) - SITIO 2												
Tratamiento	DÍA 0		DÍA 14		DÍA 50		5 MESES		8 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	4,62 x 10 ⁶	a	4,38 x 10 ⁶	a	7,11 x 10 ⁶	a	6,47 x 10 ⁶	a	4,51 x 10 ⁶	a	3,84 x 10 ⁶	a
300 m ³ /ha	5,01 x 10 ⁶	a	3,21 x 10 ⁶	a	7,02 x 10 ⁶	a	6,62 x 10 ⁶	a	4,50 x 10 ⁶	a	3,92 x 10 ⁶	a
150 m ³ /ha	7,16 x 10 ⁶	a	6,26 x 10 ⁶	a	1,13 x 10 ⁷	a	7,82 x 10 ⁶	a	5,90 x 10 ⁶	a	3,64 x 10 ⁶	a
0 m ³ /ha	5,52 x 10 ⁶	a	4,14 x 10 ⁶	a	1,01 x 10 ⁷	a	4,46 x 10 ⁶	a	5,20 x 10 ⁶	a	3,73 x 10 ⁶	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

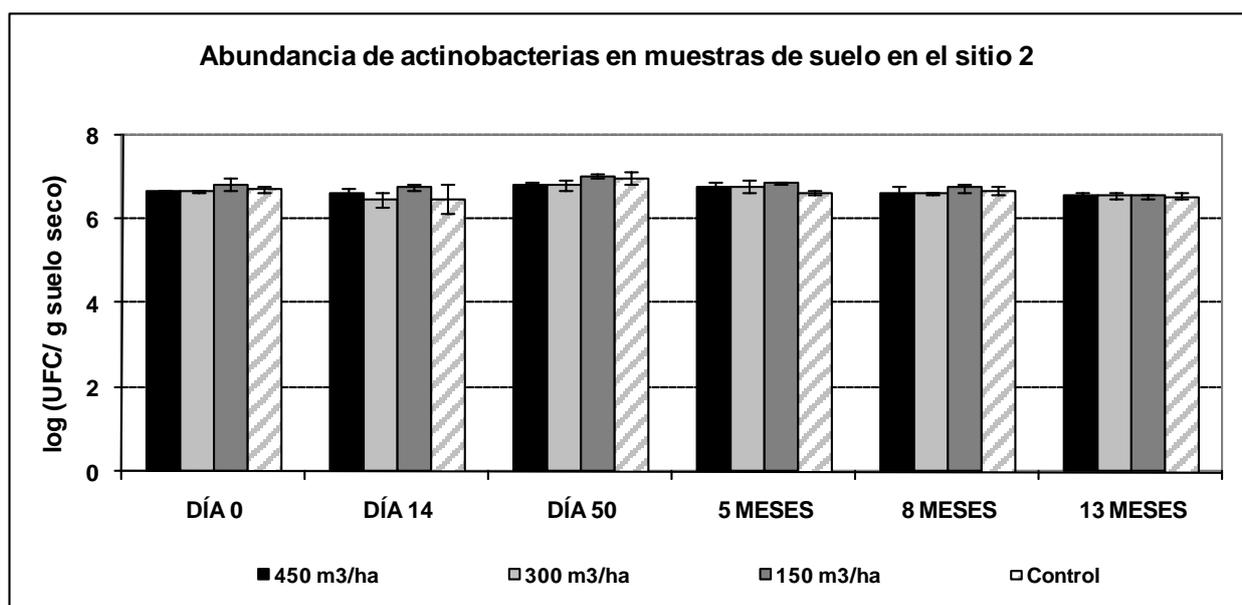


Figura 15. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo en el sitio 2.

Las poblaciones de bacterias del ciclo del nitrógeno, en general, no se vieron afectadas por el agregado de vinaza en el sitio 2. Se constataron efectos puntuales cuando se trató con la dosis máxima de vinaza (450 m³/ha): fue menor la cantidad de bacterias nitratantes a los 14 días y mayor la abundancia de bacterias desnitrificantes en un orden de magnitud respecto a la parcela control a los 5 meses de la aplicación de vinaza (Tablas 13, 14, 15 y 16; Figuras 16, 17, 18 y 19).

Tabla 13. Abundancia de bacterias amonificantes en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.

Bacterias amonificantes (NMP/ g suelo seco) - SITIO 2									
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 14		DÍA 50		5 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	1,81 x 10 ⁷	7,64 x 10 ⁶	a	5,85 x 10 ⁷	a	1,40 x 10 ⁷	a	1,40 x 10 ⁷	a
150 m ³ /ha	2,88 x 10 ⁶	1,20 x 10 ⁷	a	1,74 x 10 ⁷	a	9,87 x 10 ⁶	a	9,84 x 10 ⁶	a
0 m ³ /ha	5,50 x 10 ⁷	1,18 x 10 ⁷	a	1,21 x 10 ⁷	a	7,52 x 10 ⁶	a	1,80 x 10 ⁷	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

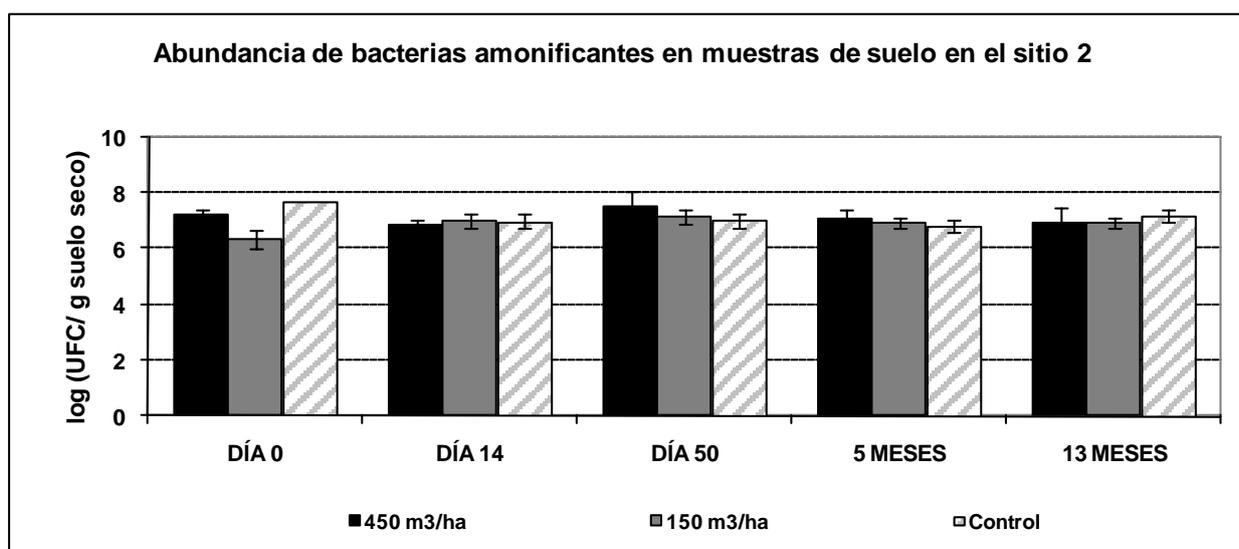


Figura 16. Abundancia de bacterias amonificantes en muestras de suelo en el sitio 2.

Tabla 14. Abundancia de bacterias desnitrificantes en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.

Bacterias desnitrificantes (NMP/ g suelo seco) - SITIO 2									
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 14		DÍA 50		5 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	4,00 x 10 ⁶	1,91 x 10 ⁷	a	6,52 x 10 ⁶	a	1,16 x 10 ⁷	a	1,88 x 10 ⁶	a
150 m ³ /ha	9,53 x 10 ⁶	9,95 x 10 ⁶	a	6,88 x 10 ⁶	a	2,41 x 10 ⁶	b	8,61 x 10 ⁵	a
0 m ³ /ha	5,50 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁷	a	1,37 x 10 ⁷	a	2,82 x 10 ⁶	b	5,90 x 10 ⁶	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

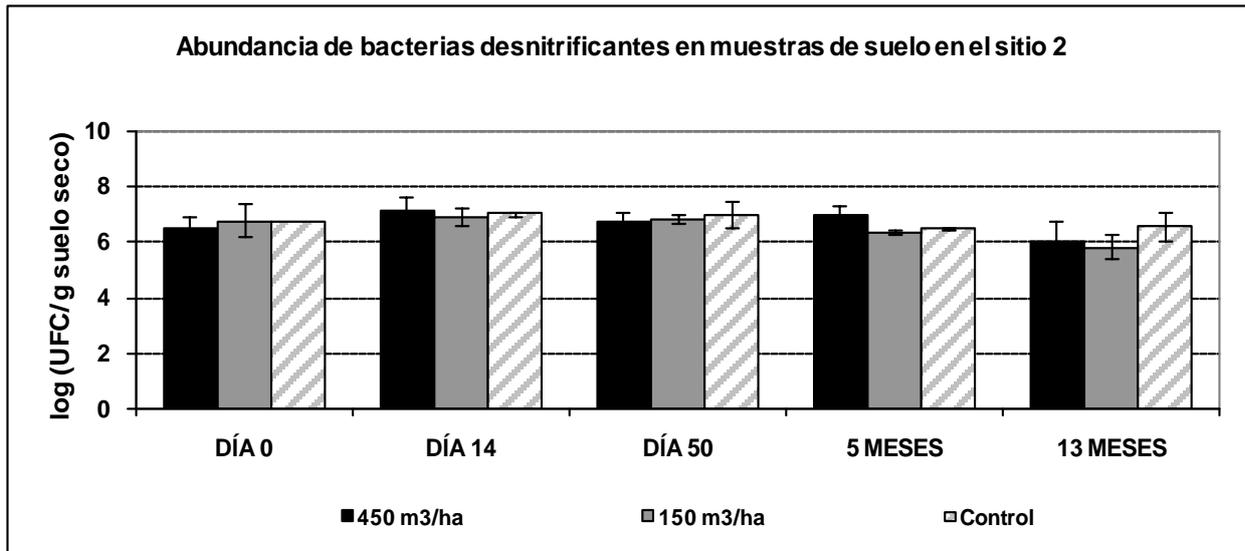


Figura 17. Abundancia de bacterias desnitrificantes en muestras de suelo en el sitio 2.

Tabla 15. Abundancia de bacterias nitrificantes en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.

Bacterias nitrificantes (NMP/ g suelo seco) - SITIO 2									
Tratamiento	DÍA 0	DÍA 14		DÍA 50		5 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	< 3,56 x 10 ⁴	< 1,50 x 10 ²	a	4,71 x 10 ²	a	6,48 x 10 ²	a	7,48 x 10 ²	a
150 m ³ /ha	< 3,71 x 10 ⁴	2,56 x 10 ²	a	3,46 x 10 ²	a	3,02 x 10 ²	a	9,39 x 10 ²	a
0 m ³ /ha	2,75 x 10 ²	2,78 x 10 ²	a	7,57 x 10 ²	a	5,42 x 10 ²	a	9,86 x 10 ²	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

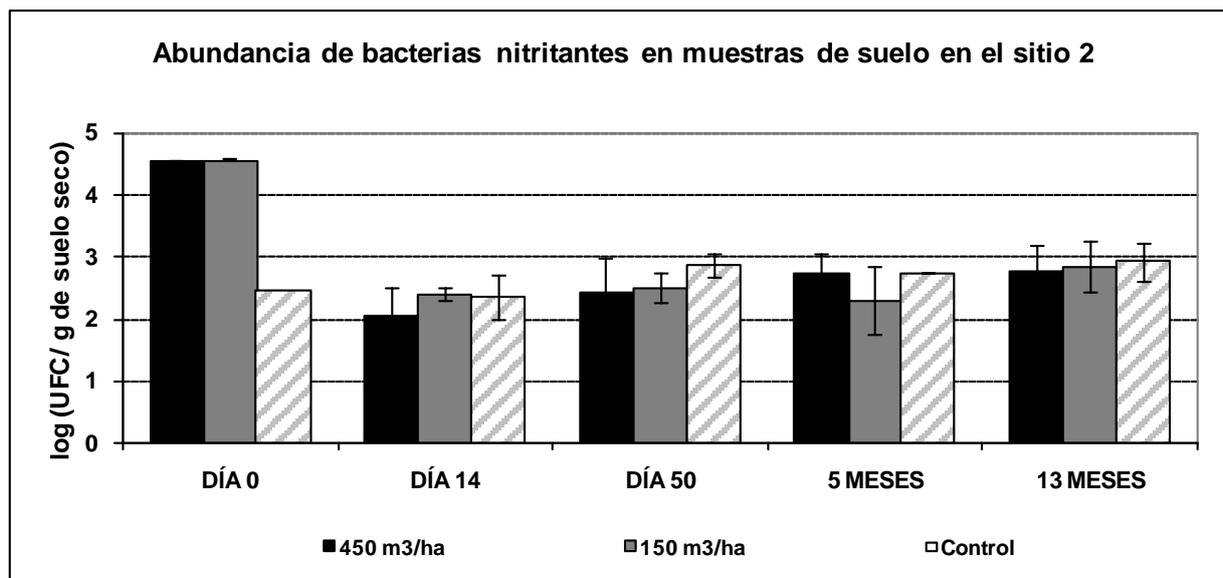


Figura 18. Abundancia de bacterias nitrificantes en muestras de suelo en el sitio 2.

Tabla 16. Abundancia de bacterias nitratantes en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.

Bacterias nitratantes (NMP/ g suelo seco) - SITIO 2											
Tratamiento	DÍA 0		DÍA 14		DÍA 50		5 MESES		13 MESES		
450 m ³ /ha	< 3,56 x10 ⁴		< 3,84 x10 ¹	b	1,93 x10 ²	a	1,81 x10 ³	a	4,57 x10 ²	a	
150 m ³ /ha	3,96 x10 ⁴		6,82 x10 ¹	a	1,59 x10 ²	a	5,11 x10 ²	a	9,45 x10 ¹	a	
0 m ³ /ha	< 3,59 x10 ¹		5,99 x10 ¹	a	6,92 x10 ¹	a	5,21 x10 ²	a	1,85 x10 ²	a	

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

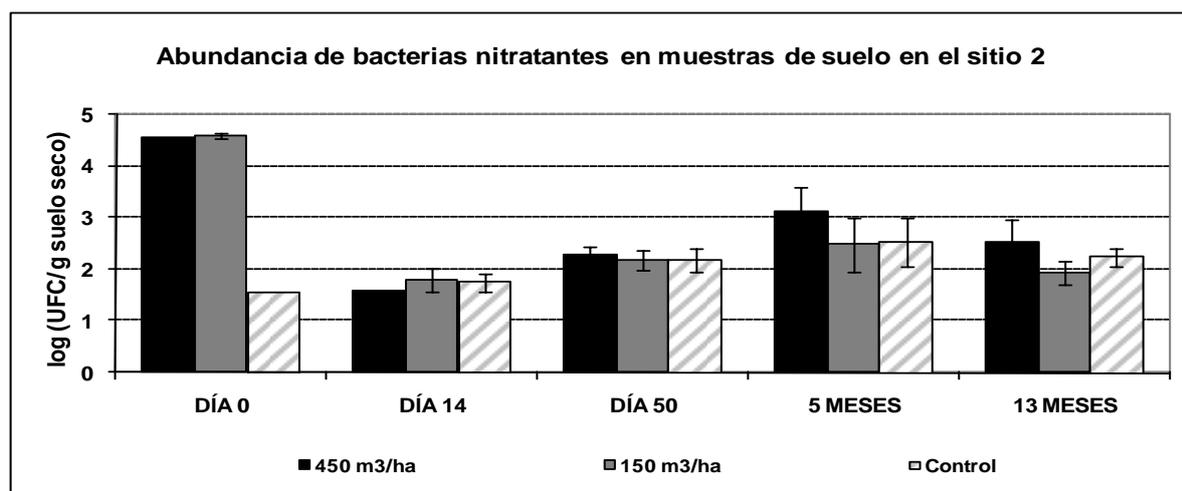


Figura 19. Abundancia de bacterias nitratantes en muestras de suelo en el sitio 2.

2. Actividad microbiana

La actividad microbiana se midió mediante la técnica de respirometría analizándose las tres muestras de suelo que recibieron las diferentes concentraciones de vinaza (150 m³/ha, 300 m³/ha y 450 m³/ha) y la muestra correspondiente al control sin aplicación de vinaza en los diferentes muestreos.

No se constataron, en el sitio 1, diferencias significativas en la actividad microbiana entre las parcelas regadas con vinaza respecto al control en ninguno de los muestreos (Tabla 17; Figura 20).

Tabla 17. Actividad microbiana en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.

Respiración microbiana (mg C-CO ₂ /kg suelo seco) - SITIO 1												
Tratamiento	DÍA 0		DÍA 18		DÍA 33		5 MESES		8 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	20	a	44	a	15	a	12	ab	21	a	17	a
300 m ³ /ha	19	a	39	a	24	a	11	b	23	a	14	a
150 m ³ /ha	21	a	45	a	15	a	16	a	19	a	20	a
0 m ³ /ha	24	a	38	a	18	a	14	ab	24	a	19	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

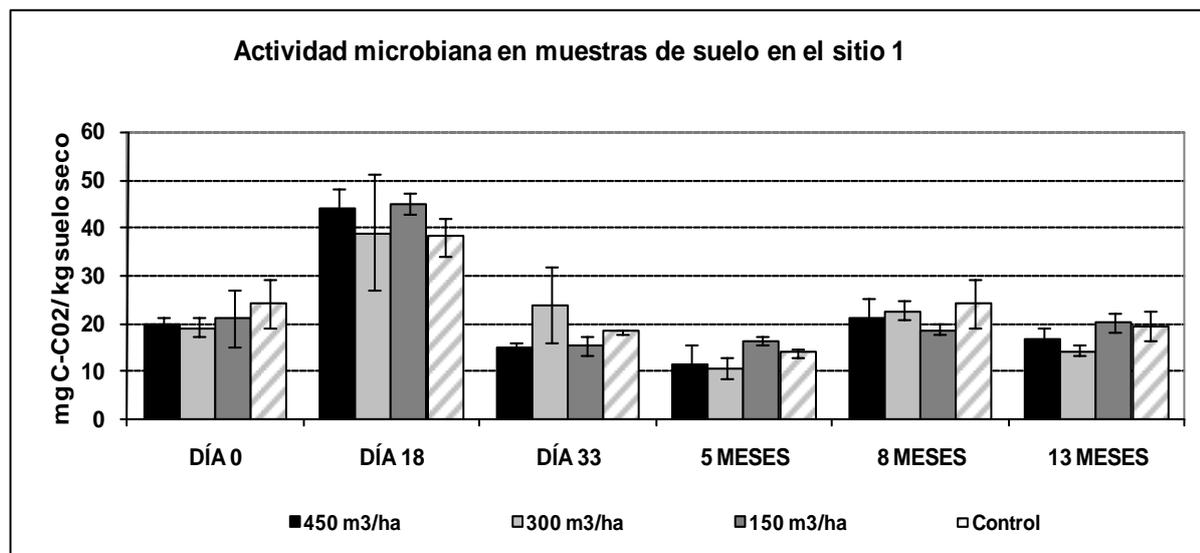


Figura 20. Actividad microbiana en muestras de suelo en el sitio 1.

En el sitio 2 se verificó un aumento de la actividad microbiana con la cantidad de vinaza agregada en los tres muestreos posteriores al riego (14 días, 50 días y 5 meses), siendo esta diferencia estadísticamente significativa respecto al control en la parcela regada con 450 m³/ha a los 14 días y a los 5 meses, y con 300 m³/ha a los 5 meses. Sin embargo, a los 8 y 13 meses luego de aplicada la vinaza, no se observaron diferencias significativas con respecto a este parámetro entre las parcelas que recibieron el tratamiento y la parcela control (Tabla 18; Figura 21).

Tabla 18. Actividad microbiana en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.

Respiración microbiana (mg C-CO ₂ /kg suelo seco) - SITIO 2												
Tratamiento	DÍA 0		DÍA 14		DÍA 50		5 MESES		8 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	23	a	45	a	35	a	23	a	19	a	24	a
300 m ³ /ha	22	a	40	ab	34	a	23	a	18	a	20	a
150 m ³ /ha	22	a	34	ab	20	b	19	ab	19	a	23	a
0 m ³ /ha	17	a	31	b	25	ab	14	b	20	a	22	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

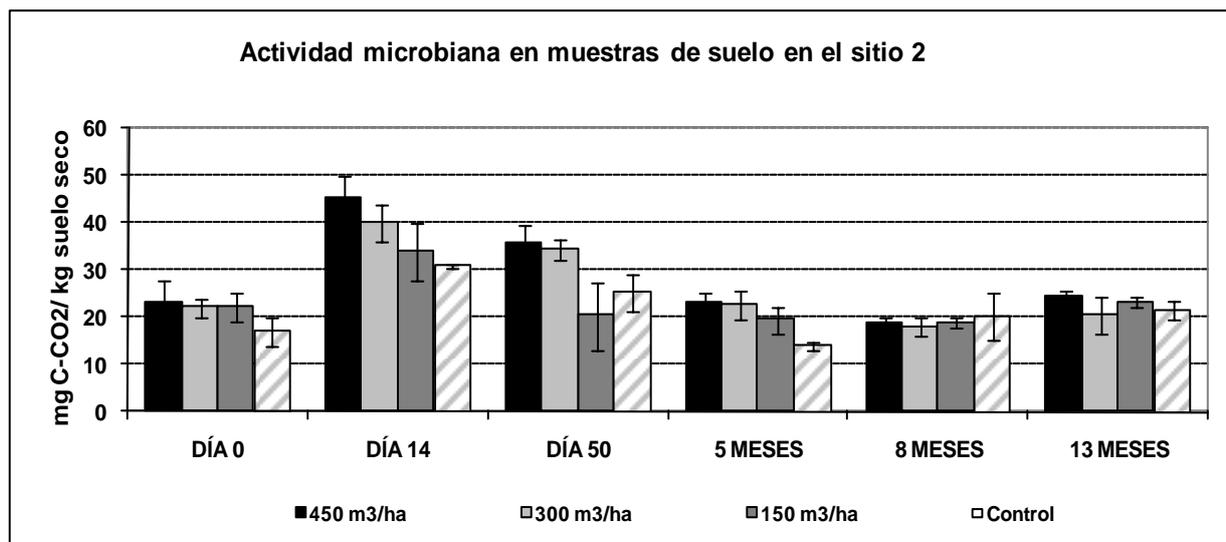


Figura 21. Actividad microbiana en muestras de suelo en el sitio 2.

3. Caracterización molecular de la comunidad bacteriana en suelos con y sin vinaza

Se estudió la estructura de la comunidad bacteriana utilizando técnicas independientes de cultivo. Para ello, a partir de muestras de suelo sin vinaza (control) y con vinaza (450 m³/ha y 150 m³/ha), se extrajo ADN de alto peso molecular (Figura 22), de concentración y pureza adecuadas para ser utilizado en reacciones de PCR (datos no mostrados).

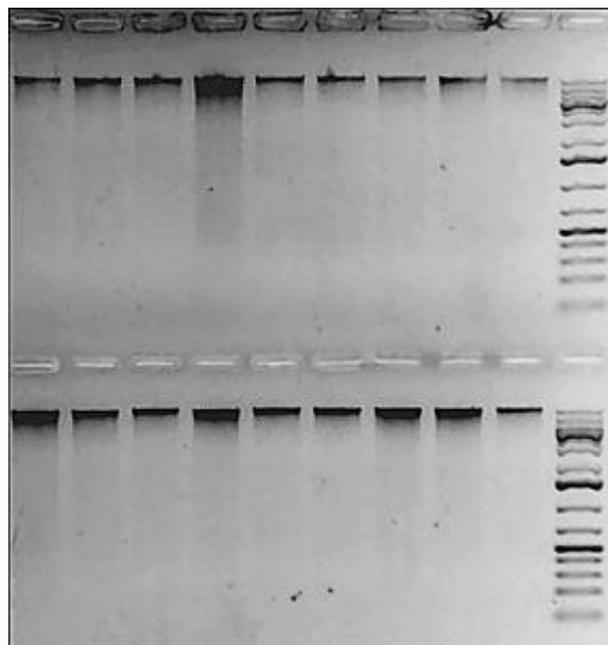


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN a partir de muestras de suelo con y sin vinaza.

Con el ADN purificado se llevó a cabo la cuantificación de bacterias totales mediante la técnica de PCR en tiempo real (rt-PCR) y el análisis de la estructura de la comunidad del dominio *Bacteria* por PCR-DGGE.

3.1. Cuantificación de bacterias totales por Real Time PCR (rt-PCR)

Se cuantificó la población total de bacterias en las muestras de suelo mediante PCR cuantitativo teniendo en cuenta de esta manera a las bacterias no cultivables. Los amplicones obtenidos con los cebadores específicos utilizados para un fragmento del gen del ARNr 16S del dominio *Bacteria* fueron de 388 pares de bases. Para poder cuantificar el gen de interés se construyó una curva de calibración a partir de diluciones seriadas del ADN genómico de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* utilizado como estándar en las corridas (Figuras 23 y 24).

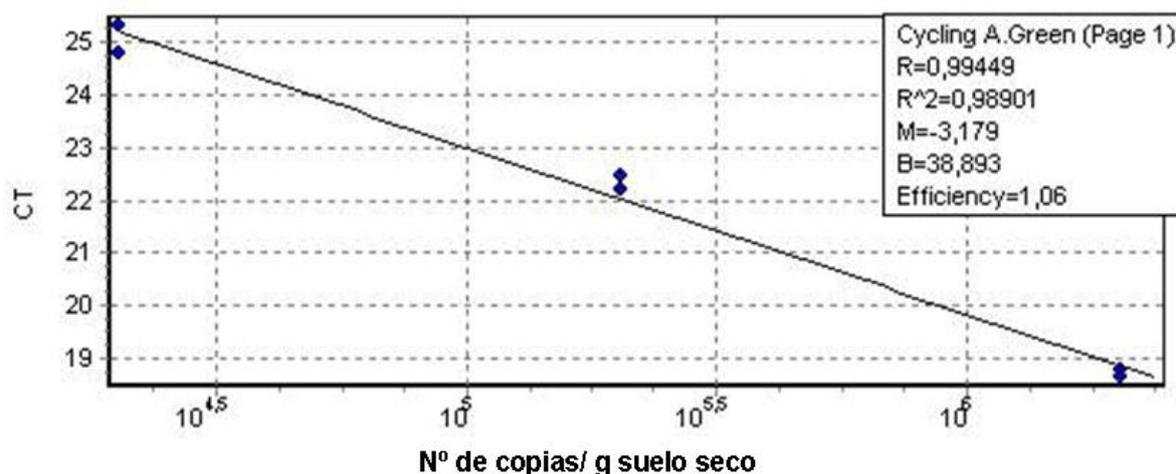


Figura 23. Curva de calibración obtenida a partir de una reacción de PCR en tiempo real donde se grafica el Crossing-threshold (C_T : corresponde al punto en donde cada muestra excede la línea de base y depende del número de copias iniciales de la muestra, la eficiencia de corte y la sensibilidad de detección) en función del número de copias. Los rombos en azul corresponden a los puntos obtenidos a partir de tres diluciones seriadas del ADN de *Pseudomonas fluorescens*.

R^2 indica cuán cerca de la correlación perfecta entre C_T y el número de copias está la curva (se aceptaron valores de R^2 mayores a 0,98). El valor de la pendiente de la curva indica la eficiencia (E) de la reacción de amplificación, siendo $E=1$ una reacción 100% eficiente (Bustin y Nolan, 2004).

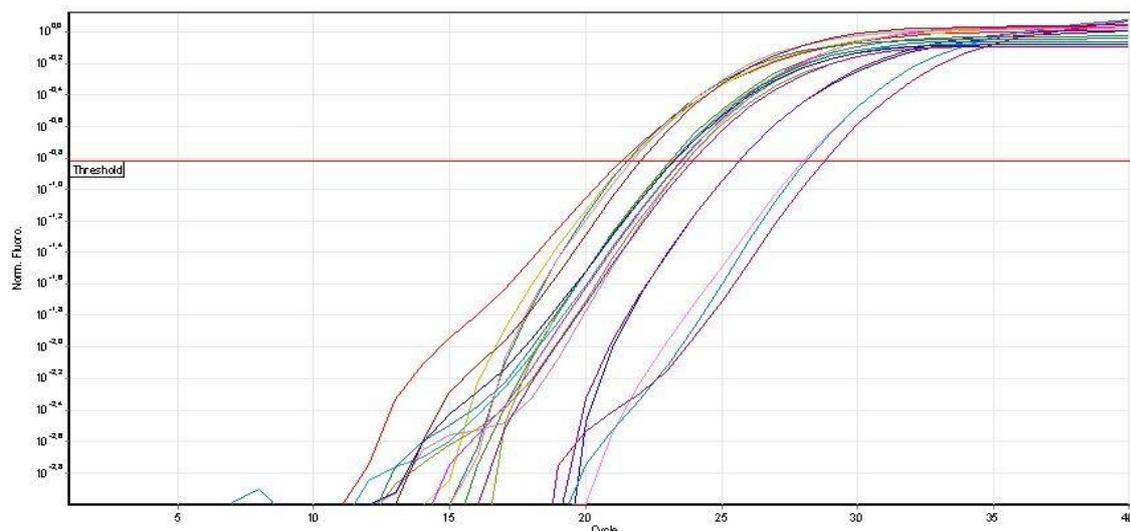


Figura 24. Curva de amplificación obtenida a partir de una reacción de rt-PCR de algunas de las muestras de suelo de interés y del ADN estándar. El valor C_T corresponde al punto en donde cada muestra excede la línea de base (Threshold) y depende del número de copias iniciales de la muestra, la eficiencia de corte y la sensibilidad de detección. Cuánto antes (en menos ciclos) se alcance el nivel detectable de fluorescencia, mayor es el número de copias de ADN iniciales de la muestra (Bustin y Nolan, 2004).

En el sitio 1 no se observaron diferencias significativas con respecto a la abundancia de bacterias totales entre la parcela control y las parcelas que recibieron aplicación de 450 m³/ha y 150 m³/ha de vinaza. Este comportamiento se pudo constatar en todos los momentos de muestreo (día 0, 18 y 33 días, 5 y 13 meses) (Tabla 19; Figura 25).

En las parcelas del sitio 2 no se registraron diferencias significativas en la cantidad de bacterias totales entre las parcelas regadas con vinaza y la parcela control, en ninguno de los muestreos realizados luego de aplicar la misma (14 y 50 días, 5 y 13 meses). Sin embargo, para el momento inicial de muestreo previo a la aplicación de vinaza, sí se encontraron diferencias significativas en la abundancia de bacterias totales; en la parcela que luego recibiría la mayor dosis de vinaza la cantidad de las mismas se encontró dos órdenes por encima que la hallada en las otras dos parcelas (Tabla 20; Figura 26).

Tabla 19. Abundancia de bacterias totales en muestras de suelo en el sitio 1 antes y después de la aplicación de vinaza.

Abundancia de bacterias totales (Nº de copias/ g suelo seco) - SITIO 1										
Tratamiento	DÍA 0		DÍA 18		DÍA 33		5 MESES		13 MESES	
450 m ³ /ha	3,58 x 10 ⁹	a	3,09 x 10 ⁹	a	1,37 x 10 ⁹	a	5,24 x 10 ⁹	a	2,36 x 10 ⁷	a
150 m ³ /ha	6,06 x 10 ⁹	a	8,22 x 10 ⁹	a	3,25 x 10 ⁹	a	6,06 x 10 ⁹	a	7,41 x 10 ⁶	a
0 m ³ /ha	9,22 x 10 ⁸	a	1,20 x 10 ¹⁰	a	3,21 x 10 ⁹	a	1,97 x 10 ⁹	a	1,64 x 10 ⁷	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

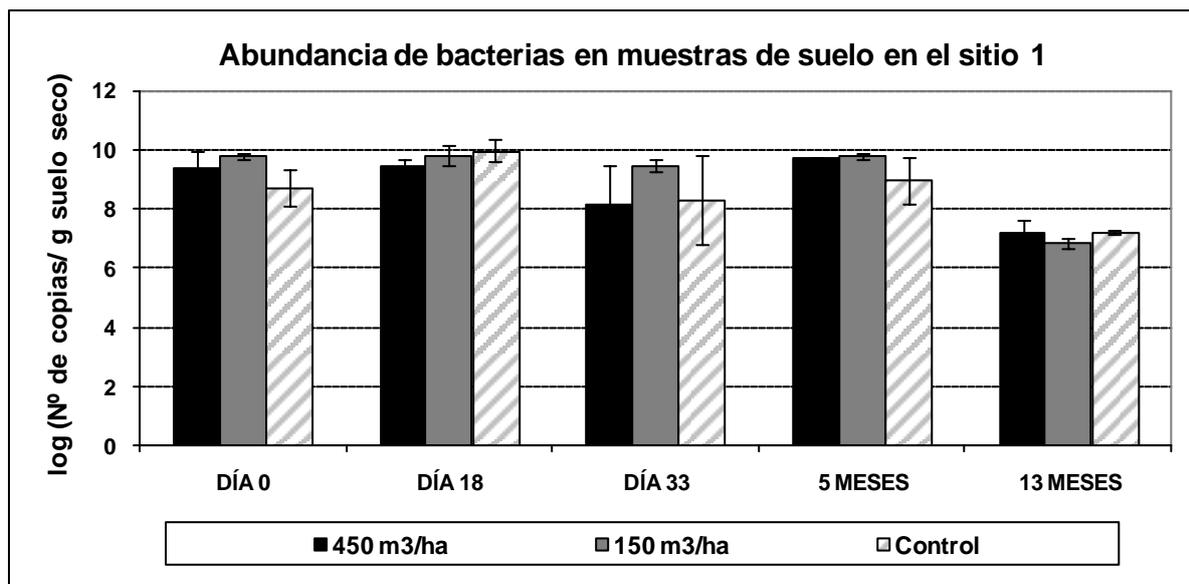


Figura 25. Abundancia de bacterias totales en muestras de suelo en el sitio 1.

Tabla 20. Abundancia de bacterias totales en muestras de suelo en el sitio 2 antes y después de la aplicación de vinaza.

Abundancia de bacterias totales (Nº de copias/ g suelo seco) - SITIO 2										
Tratamiento	DÍA 0		DÍA 14		DÍA 50		5 MESES		13 MESES	
450 m³/ha	1,42 x 10 ¹⁰	a	1,30 x 10 ¹⁰	a	1,84 x 10 ¹⁰	a	5,46 x 10 ⁹	a	3,57 x 10 ⁷	a
150 m³/ha	7,57 x 10 ⁸	b	1,81 x 10 ¹⁰	a	1,75 x 10 ⁹	a	6,18 x 10 ⁹	a	1,02 x 10 ⁸	a
0 m³/ha	9,45 x 10 ⁸	b	8,51 x 10 ⁹	a	1,06 x 10 ¹⁰	a	1,70 x 10 ⁹	a	9,60 x 10 ⁷	a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas entre los tratamientos para cada momento de muestreo ($p < 0,05$).

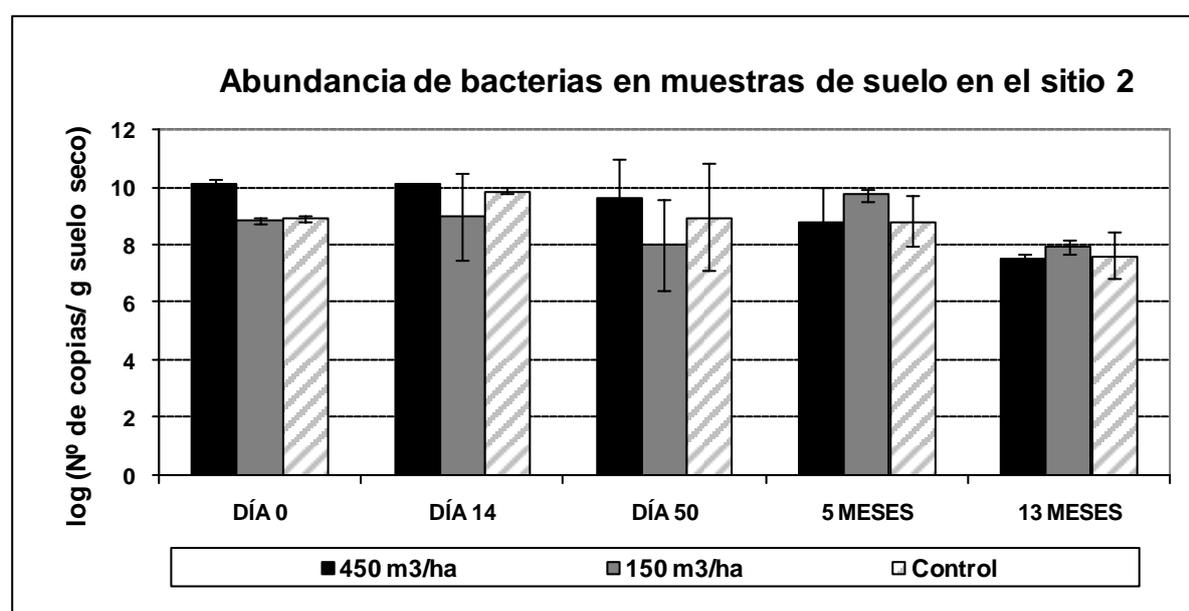


Figura 26. Abundancia de bacterias totales en muestras de suelo en el sitio 2.

3.2. Análisis de diversidad del dominio *Bacteria* mediante PCR-DGGE

A partir del ADN extraído se realizaron reacciones de PCR utilizando cebadores específicos (F968-GC y R1378) para la región V6 del gen del ARNr 16S que es la región de mayor variabilidad dentro del mismo, permitiendo de esta forma optimizar el análisis de la comunidad bacteriana (Brons y van Elsas, 2008). Estos cebadores se unen a las bases 968-984 y 1378-1401 del gen (posiciones correspondientes al gen del ARNr de *Escherichia.coli*). La banda obtenida a partir de esta reacción fue de 450 pares de bases (Araújo *et al.*, 2002), de los cuales 410 pb corresponden al amplicón de interés y 40 pb a la grampa GC.

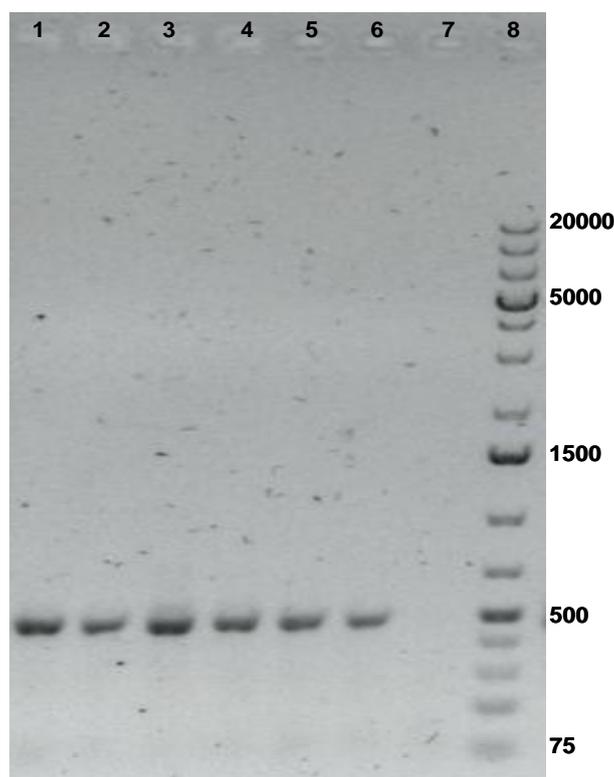


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para un fragmento del gen del ARNr 16S de *Bacteria*. 1, 2 y 3- Réplicas de muestras de suelo del sitio 1 a los 30 días del riego con 450 m³/ha de vinaza; 4, 5 y 6- Réplicas de muestras de suelo del sitio 1 a los 30 días del riego con 150 m³/ha de vinaza; 7- Control negativo (C-); 8- Marcador de peso molecular Gene Ruler 1Kb plus DNA Ladder -Thermo Scientific- (75-20000 pb).

Los resultados obtenidos a partir de la amplificación del gen del ARNr 16S utilizando la técnica de PCR fueron los esperados ya que se obtuvieron bandas del tamaño indicado (Figura 27). En todos los casos las bandas fueron únicas sin visualizarse bandas inespecíficas. El control negativo (C-) se realizó colocando agua bidestilada en vez de ADN y no se visualizaron bandas, por lo que se descartó contaminación en el ensayo y se validaron los resultados obtenidos para las muestras de ADN.

Los productos de PCR se separaron por DGGE sembrándose diferentes volúmenes de cada muestra, para poder de esta manera, igualar la cantidad de ADN por pocillo.

Los patrones de bandas visualizados en los geles de DGGE (Figura 28) revelaron que las comunidades bacterianas, para cada sitio y momento de muestreo, están compuestas de grupos bien diferenciados entre los tratamientos y poseen un alto porcentaje de similitud entre las réplicas de cada parcela.

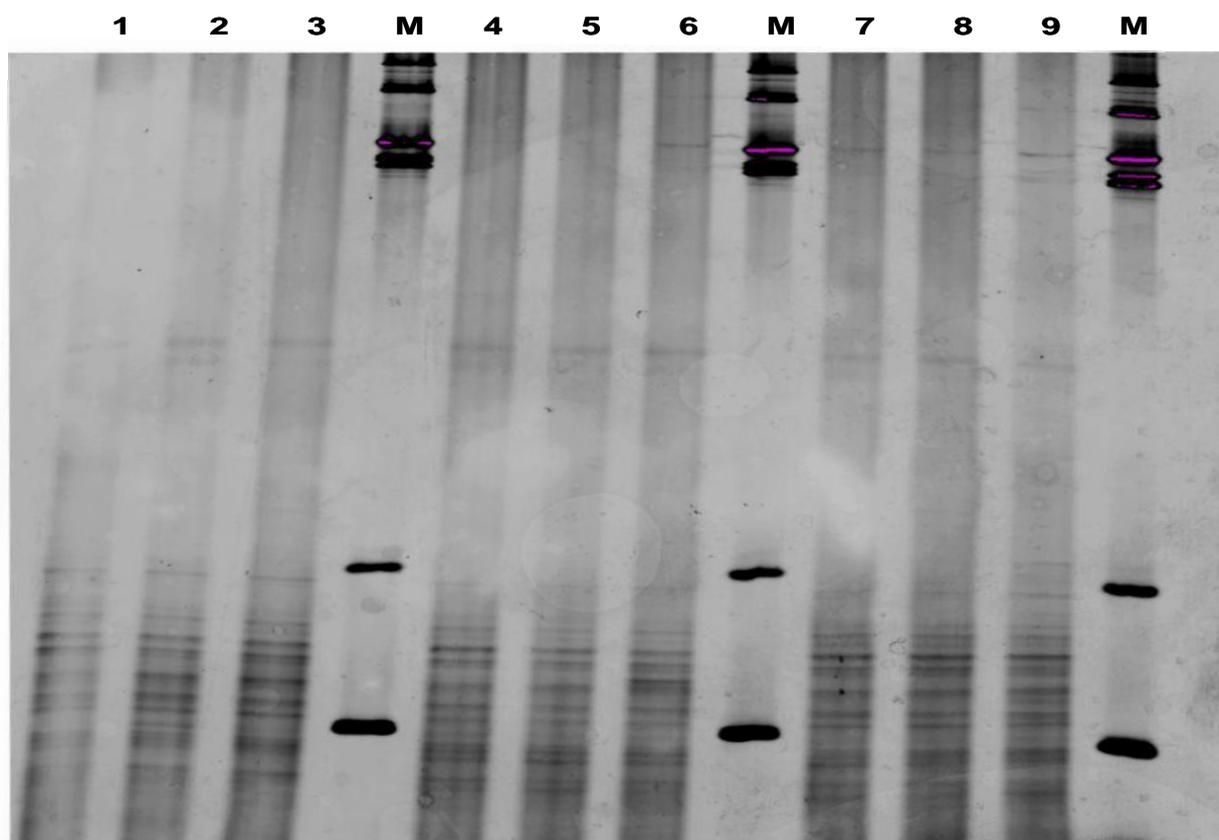


Figura 28. Gel de DGGE de los productos de PCR para *Bacteria*. **M:** marcador de migración; **1, 2 y 3:** Réplicas de muestras de suelo del sitio 2 a los 30 días del riego con 450 m³/ha de vinaza; **4, 5 y 6:** Réplicas de muestras de suelo del sitio 2 a los 30 días del riego con 150 m³/ha de vinaza; **7, 8 y 9:** Réplicas de muestras de suelo del sitio 2 de la parcela control a los 30 días luego del riego.

Con el programa GelCompar II se analizaron los geles en las zonas donde se presentaron las bandas más nítidas. Con el patrón de bandas obtenido, se realizó un análisis de agrupamiento de las muestras en forma de dendogramas.

En el muestreo realizado antes de la aplicación de vinaza (tiempo 0) se distinguen comunidades bacterianas bien diferenciadas entre las tres parcelas, tanto para el sitio 1 como para el sitio 2 (Figura 29). En el caso del sitio 1 las réplicas de cada tratamiento reflejaron una alta similitud entre ellas: en la parcela 1 y en la 3, que recibieron 450 m³/ha y 150 m³/ha de vinaza respectivamente, las réplicas mostraron un 100% de similitud, mientras que las réplicas de la parcela 4 (control sin vinaza) se asemejaron entre un 95 y 98%. Las

comunidades bacterianas de las parcelas 1 y 3 se parecen en un 53%, y se asemejan a la comunidad bacteriana de la parcela 4 en un 47%. En el sitio 2 también se observó que las réplicas dentro de cada parcela se asemejaron mucho: en la parcela 5, que recibió 450 m³/ha de vinaza, el porcentaje de similitud se encontró entre 84 y 98%, en la parcela 7 (recibió 150 m³/ha de vinaza) entre 94 y 100% y en la parcela 8 (control sin vinaza) fue de 100%. La similitud entre las comunidades bacterianas de las parcelas 7 y 8 se ubicó en un 71% y éstas mostraron un porcentaje de similitud del 64% con respecto a la comunidad bacteriana de la parcela 5.

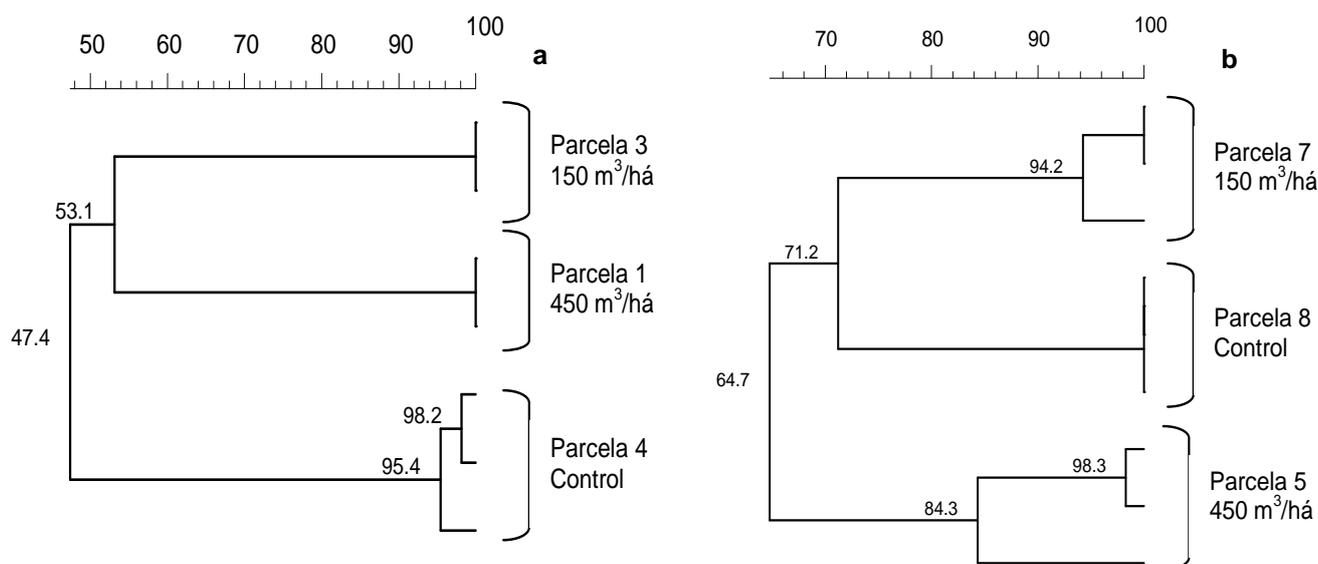


Figura 29. Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad de *Bacteria* antes de la aplicación de vinaza **a)** en muestras de suelo del sitio 1 y **b)** en muestras de suelo del sitio 2.

A los 18 días luego del riego (sitio 1) se mantuvo la tendencia de los agrupamientos visualizándose claramente 3 grupos diferentes de comunidades bacterianas según la parcela (Figura 30). Al igual que en el muestreo previo a la aplicación, se observó para el sitio 1, un alto porcentaje de similitud entre las réplicas de cada parcela: 100%, 92-100% y 93-97% entre réplicas de las parcelas 1, 3 y 4 respectivamente. Los agrupamientos observados en este sitio fueron los siguientes: las comunidades bacterianas de la parcela 1 y de la parcela 3, que recibieron 450 m³/ha y 150 m³/ha de vinaza respectivamente, mostraron una similitud del 62% entre ellas; éstas a su vez mostraron una semejanza del 50% con la comunidad bacteriana presente en la parcela 4 (control sin vinaza). En el caso del sitio 2, no se presentan los resultados para este momento de muestreo (14 días luego de la aplicación de vinaza) debido a problemas registrados en la amplificación de las muestras correspondientes a las réplicas de la parcela 8 (control sin vinaza); sin los datos de esta parcela es inviable realizar

comparaciones y sacar conclusiones de los efectos causados por la vinaza sobre la comunidad bacteriana de este sitio.

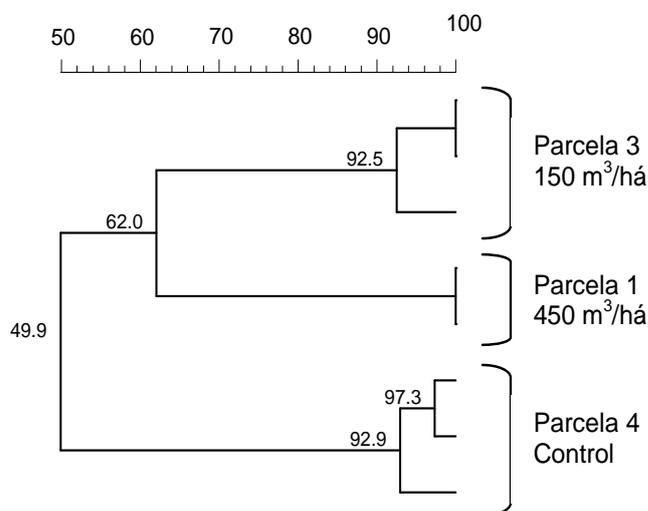


Figura 30. Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad de *Bacteria* en muestras de suelo del sitio 1 luego de 18 días de aplicada la vinaza.

En el sitio 1 a los 33 días luego de la aplicación de vinaza se distingue claramente, como en los momentos anteriores, tres grupos de comunidades bacterianas diferentes en cada parcela; a su vez, en todos los casos, el porcentaje de similitud entre réplicas de cada parcela fue alto (Figura 31). En el caso de la parcela 1, que recibió 450 m³/ha de vinaza, la similitud entre réplicas se halló entre el 89 y 97%; las réplicas de la parcela 3, que fue tratada con 150 m³/ha, presentaron una similitud del 96-97% y para la parcela 4 (control sin vinaza) la similitud entre réplicas se ubicó en el rango de 79-97%. Las comunidades bacterianas de las parcelas 1 y 3 presentaron una similitud del 61% entre ellas y del 53% con la comunidad bacteriana presente en la parcela control, siendo estos resultados muy similares a los observados a los 18 días luego de la aplicación de vinaza.

Luego de 50 días del tratamiento con vinaza, en el sitio 2, se identificaron tres grupos bien diferenciados de comunidades bacterianas para cada tratamiento al igual que en el primer momento de muestreo previo a la aplicación (Figura 15). La similitud entre réplicas de cada tratamiento se halló entre 61-100%, 77-95% y 83-90% para las parcelas 5 (recibió 450 m³/ha de vinaza), 7 (recibió 150 m³/ha de vinaza) y 8 (parcela control) respectivamente. Las comunidades bacterianas de las parcelas 7 y 8 presentaron una similitud del 61% formando un grupo, que a su vez, mostró una similitud del 41% con la comunidad bacteriana de la parcela que recibió la mayor dosis de vinaza (parcela 5).

Debido a problemas registrados durante la amplificación de la mayoría de las muestras tomadas a los 5 y 13 meses luego de la aplicación de vinaza, es que no se pudo realizar el estudio de la estructura de la comunidad bacteriana para dichos momentos. Con respecto a las muestras tomadas a los 8 meses luego del tratamiento, no se estudió la estructura de la comunidad bacteriana ni la abundancia de bacterias totales ya que desde un principio se decidió realizar únicamente los análisis clásicos y no los moleculares para estas muestras.

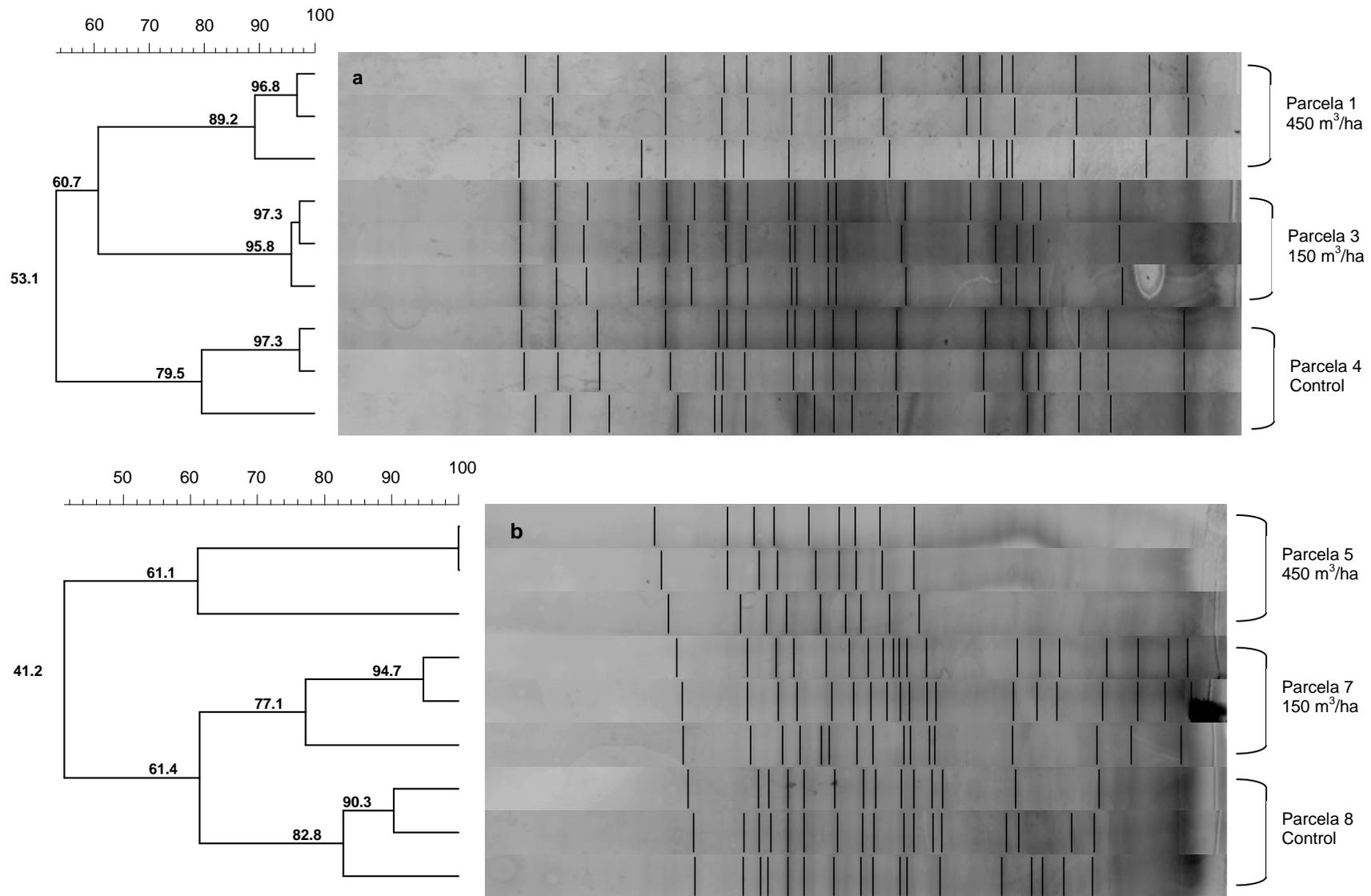


Figura 31. Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad de *Bacteria a)* en muestras de suelo del sitio 1 luego de 33 días de aplicada la vinaza y *b)* en muestras de suelo del sitio 2 luego de 50 días de aplicada la vinaza.

DISCUSIÓN

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

En Uruguay no existen antecedentes de investigaciones que revelen datos acerca de las comunidades microbianas presentes en suelos destinados al cultivo de caña de azúcar y de sus cambios debido a la aplicación de vinaza. En este estudio se llevó a cabo la cuantificación de bacterias heterótrofas aerobias, actinobacterias y bacterias del ciclo del nitrógeno: amonificantes, desnitrificantes y nitrificantes (nitritantes y nitratantes).

Para evaluar el efecto de la vinaza sobre los microorganismos del suelo se determinó la abundancia de dichos grupos bacterianos mediante técnicas dependientes de cultivo utilizando los métodos de recuento en placa y del número más probable (NMP). Estos ensayos se llevaron a cabo antes y después de la aplicación de diferentes dosis de vinaza en dos suelos característicos de la zona de Bella Unión y de composiciones distintas. La metodología de recuento en placa es utilizada tradicionalmente y a pesar de poseer limitaciones permite obtener información del componente heterótrofo activo de una población o comunidad (Kirk *et al.*, 2004). La técnica del NMP ha sido desarrollada para poder cuantificar bajos números de microorganismos de interés. Esta aproximación semi-cuantitativa se basa en la detección de compuestos producidos durante el crecimiento microbiano, que genera cierto número de tubos positivos por dilución y que se expresa como un índice de NMP (Zitz *et al.*, 2011).

La abundancia de bacterias heterótrofas encontrada, previo a la aplicación de vinaza, se ubicó en el orden de 10^7 - 10^8 UFC/ g de suelo seco para el sitio 1 y de 10^7 UFC/ g de suelo seco en el sitio 2. En la India, se hallaron valores promedio de 8×10^8 UFC/ g de suelo de este grupo bacteriano en suelos cultivados con caña de azúcar (Shukla *et al.*, 2008), mientras que en suelos de pradera de Uruguay se reportaron valores promedio de $2,5 \times 10^7$ UFC/ g de suelo (Bajsa, 2008). Se constató homogeneidad entre las parcelas analizadas para cada sitio en relación a esta población bacteriana debido a la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras estudiadas.

Luego de aplicada la vinaza, en las parcelas del sitio 1 que recibieron alguna dosis de la misma, se observó un aumento en esta población bacteriana en las muestras tomadas a los 18 días, 33 días y 5 meses; luego de 8 y 13 meses de la aplicación la abundancia de bacterias heterótrofas fue igual en las cuatro parcelas. En estudios realizados por Orlando (1983) se observó una alta proliferación de microorganismos en suelos tratados con vinaza hasta los 30 días después de la aplicación, registrándose luego una tendencia descendente de las poblaciones microbianas. En India se llevaron a cabo otros estudios en los que se adicionaba a suelos utilizados para agricultura, lodos del tratamiento de residuos de destilerías; en estos casos se observaron aumentos en el número de

bacterias heterótrofas para diferentes cantidades aplicadas (Tripathi, 2011). Cabe destacar que en el sitio 1 se registró un aumento significativo de la población de bacterias heterótrofas en las parcelas que fueron tratadas con 450 m³/ha y 300 m³/ha de vinaza. Dicho aumento puede deberse a que el tapado de las semillas en estas parcelas fue posterior al de las otras parcelas y muy próximo al muestreo. Mínimas alteraciones en los sistemas edáficos pueden tener como consecuencia cambios en el ambiente que a su vez alteran la actividad microbiana (Murphy *et al.*, 2007).

Las poblaciones de actinobacterias, previo a la aplicación de vinaza, registraron valores en el orden de 10⁵-10⁶ UFC/g de suelo seco para el sitio 1 y 10⁶ UFC/g de suelo seco para el sitio 2, observándose variabilidad en la abundancia de las mismas entre las parcelas del sitio 1 pero no para el sitio 2. Estudios realizados en la India en suelos cultivados con caña de azúcar reportaron valores promedio de estas poblaciones de 5 x10³ UFC/g de suelo (Shukla *et al.*, 2008), mientras que en Colombia en dos suelos cultivados con maíz se hallaron valores promedio de 3,4 x 10⁴ y 8,0 x 10⁴ UFC/g de suelo (Montenegro, 2008). Los valores reportados en los dos trabajos antes mencionados se encuentran muy por debajo de los valores obtenidos en esta investigación. En suelos de praderas de Uruguay la abundancia de actinobacterias hallada se encontró entre 4 x 10⁶ y 6 x 10⁷ UFC/g suelo (Bajsa, 2008), siendo éstos similares a los resultados obtenidos en este trabajo. La aplicación de vinaza en el sitio 2 no generó cambios en la abundancia de este grupo de bacterias en ninguno de los momentos de muestreo respecto a la parcela control. Sin embargo, en el sitio 1 con los tratamientos de 300 y 450 m³/ha, se observó un aumento significativo en la cantidad de actinobacterias respecto a la parcela control. El mayor efecto apareció en la parcela que recibió la dosis de 300 m³/ha puesto que se constató un aumento de un orden de magnitud en el número de las mismas a los 33 días luego de la aplicación respecto a las condiciones iniciales de esta investigación. Estudios realizados en China, a partir de suelos cultivados con caña de azúcar que recibieron tratamiento con vinaza, reportaron un incremento de 242 veces en la población de actinobacterias respecto al control (Meng *et al.*, 2009). Por otro lado, en estudios llevados a cabo en Colombia en dos suelos diferentes utilizados para cultivo de maíz y regados con vinaza, no se observaron cambios en la abundancia de estos microorganismos (Montenegro, 2008).

Los suelos elegidos para esta investigación poseen composiciones distintas por lo que las diferentes respuestas a la aplicación de vinaza observadas en ambos pueden deberse a las características de los mismos. El horizonte A del suelo del sitio 2 posee más cantidad de arcilla que el mismo horizonte del suelo del sitio 1, siendo éstos franco-arcilloso y franco-arcilloso-arenoso, respectivamente. Las arcillas tienen mayor capacidad para retener las moléculas orgánicas incrementándose de esta manera la densidad de los suelos. A partir de estudios realizados por Tejada y González (2005) se ha puesto de manifiesto que existe una correlación entre la densidad

del suelo y la biomasa microbiana; cuando aplicaron altas dosis de vinaza se pudo observar un aumento de la densidad del suelo y una disminución de la biomasa microbiana, mientras que al utilizar bajas concentraciones de la misma ocurrió lo contrario ya que disminuyó la densidad del suelo y aumentó la biomasa microbiana. Debido a este efecto es que se podrían explicar los resultados diferentes en relación a la abundancia de actinobacterias entre ambos sitios estudiados.

Con respecto a las bacterias del ciclo del nitrógeno, se observó un aumento en la población de bacterias amonificantes presentes en muestras de suelo del sitio 1 a los 33 días y a los 13 meses luego de la aplicación de vinaza en la parcela que recibió la mayor dosis de la misma (450 m³/ha). A su vez, efectos puntuales se registraron para las poblaciones de bacterias desnitrificantes que se incrementaron sólo en el primer muestreo luego de la aplicación de vinaza y de bacterias nitratantes cuya población aumentó únicamente en el último muestreo. En el sitio 2 solamente se registraron efectos puntuales sobre algunas de las poblaciones de bacterias del ciclo del nitrógeno que dependieron del momento de muestreo y de la cantidad de vinaza aplicada: la dosis de 450 m³/ha de vinaza disminuyó el número de bacterias nitratantes a los 14 días y estimuló la población de bacterias desnitrificantes a los 5 meses.

Los resultados antes expuestos para ambos sitios podrían estar indicando, que en general, no hubo variación significativa en la densidad de las cuatro poblaciones bacterianas estudiadas en ninguno de los momentos de muestreo ni con los diferentes tratamientos aplicados, sugiriendo por lo tanto que el tamaño de estas comunidades es relativamente estable.

Los valores obtenidos en esta tesis para bacterias nitríticas y nitratantes, en ambos sitios y para todos los momentos de muestreo, se encontraron en el rango de $10^2 - 10^3$ y de $10^1 - 10^2$ células por gramo de suelo seco, respectivamente. Estos datos se encuentran muy por debajo de los reportados en una investigación donde se cuantificó el número de estas poblaciones bacterianas a partir de muestras de suelo aluvial y de suelo arcilloso de Taiwán, sometidos ambos, tanto a agricultura convencional como sustentable. En el caso de las bacterias nitríticas los valores registrados se mantuvieron siempre en 10^6 sin encontrarse diferencias significativas entre los dos tipos de suelo ni entre las prácticas agrícolas convencionales y las sustentables, pero sí se detectaron diferencias significativas cuando se estudiaron las comunidades de bacterias nitratantes: el número de éstas varió entre 10^5 y 10^6 para los suelos arcillosos de Taiwán con agricultura convencional y sustentable, respectivamente, mientras que en los suelos aluviales el rango de las mismas se encontró entre 10^4 y 10^5 para agricultura convencional y sustentable, respectivamente (Chao *et al.*, 1996). Las diferencias que se observan entre ambos trabajos podrían deberse a composiciones diferentes de los suelos estudiados, condiciones climáticas distintas y/o al tiempo de incubación de las muestras antes de la cuantificación. En esta tesis la cuantificación de bacterias nitríticas y nitratantes se llevó a cabo luego de 7 días de incubación con agitación a temperatura

ambiente (25°C), mientras que en el trabajo de Chao *et al.* (1996) las muestras fueron incubadas 6 semanas a temperatura ambiente. La gran brecha observada en los números de bacterias nitritantes y nitratantes entre ambos trabajos podría deberse, en parte, a los diferentes tiempos de incubación utilizados en cada caso. En una investigación llevada a cabo por Papen y Berg (1998) donde cuantificaron bacterias heterótrofas nitrificantes presentes en suelos ácidos de un bosque de coníferas, la incubación se realizó a 28°C durante 14 días y para favorecer la aireación los tubos se agitaron vigorosamente durante 10 segundos todos los días. Los autores reportan que el oxígeno es un limitante en la producción de nitrito durante la nitrificación heterotrófica por lo que realizando las agitaciones diarias lograron detectarlo hasta en los tubos que fueron inoculados con las menores diluciones de suelo. Estos resultados podrían estar indicando que los bajos números de bacterias nitrificantes, en particular de bacterias nitritantes, encontrados en esta tesis podrían deberse también a este motivo; si se hubiera incubado más tiempo y agitado diariamente, quizás los valores encontrados para estas bacterias habrían sido mayores. A su vez, se ha reportado que el proceso de nitrificación es llevado a cabo mayoritariamente por bacterias autótrofas aunque las bacterias heterotróficas también pueden participar y generar una inhibición del mismo debido a la producción de glucosa y compuestos orgánicos; la ausencia o muy bajos niveles de nitrato podrían estar asociados a una supresión de la nitrificación por parte de las bacterias heterotróficas (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2007). Por lo tanto, la baja cantidad de bacterias nitrificantes detectada en esta tesis podría estar relacionada con una inhibición de la nitrificación por parte de bacterias nitrificantes heterótrofas presentes en las muestras de suelo analizadas.

Los valores de abundancia hallados en esta tesis para las bacterias desnitrificantes se encontraron en el orden de 10^6 células por gramo de suelo seco en ambos sitios en el momento inicial de muestreo y a los 13 meses luego del tratamiento con vinaza, mientras que en los muestreos intermedios la cantidad de las mismas se ubicó entre 10^6 y 10^7 células por gramo de suelo seco. Estos valores son similares a los reportados por Chèneby *et al.* (2000) a partir de la cuantificación de bacterias desnitrificantes presentes en tres suelos destinados a la agricultura localizados al noreste de Francia; en dos de los suelos los valores para las mismas se ubicaron en el orden de 10^6 bacterias por gramo de suelo seco y en el tercer suelo la abundancia fue algo menor situándose en 10^5 bacterias por gramo de suelo seco. Con respecto a los valores obtenidos en nuestro trabajo se observó un aumento en la densidad de esta población con respecto al control sin vinaza, a los 18 días y a los 5 meses luego de la aplicación de vinaza en el sitio 1 y sitio 2, respectivamente. El comportamiento para este grupo bacteriano en ambos suelos fue semejante al observado para otras poblaciones bacterianas estudiadas en esta tesis: hubo un aumento en la abundancia luego de la aplicación de vinaza que perduró durante unos meses volviendo a los valores iniciales en el muestreo de los 13 meses.

La abundancia de bacterias amonificantes se encontró entre 10^6 y 10^7 bacterias por gramo de suelo seco en todos los momentos de muestreo para ambos sitios, registrándose diferencias significativas únicamente entre la parcela que recibió la dosis más alta de vinaza ($450 \text{ m}^3/\text{ha}$) respecto al control a los 33 días y a los 13 meses luego de la aplicación en el sitio 1. La densidad de bacterias amonificantes hallada en suelos no rizosféricos, utilizados para cultivo de trigo, se encontró en $1,8 \times 10^6$ células por gramo de suelo (Carrillo, 2003), siendo estos resultados numéricamente similares a los obtenidos en este trabajo. A su vez, estudios realizados a partir de praderas en Austria que recibieron aplicaciones de lodos provenientes de ganado, mostraron un aumento significativo de la biomasa microbiana y de los niveles de mineralización de N con respecto a la parcela control que no recibió tratamiento (Kandeler *et al.*, 1994). Los resultados antes mencionados podrían estar indicando que la abundancia de bacterias amonificantes presentes en las praderas aumentó en las parcelas que recibieron tratamiento al igual que ocurrió en nuestro trabajo, para algunos de los momentos de muestreo, cuando se aplicó la dosis más alta de vinaza ($450 \text{ m}^3/\text{ha}$). El incremento de este grupo de bacterias, como consecuencia de aplicar residuos con alta carga de materia orgánica, podría estar sugiriendo que el N orgánico está siendo transformado a N inorgánico por las mismas de forma tal, que la disponibilidad de este último aumentaría y podría ser asimilado por plantas y otros microorganismos que no pueden incorporar el N en otro estado.

2. Actividad microbiana

La actividad microbiana medida por respirometría está relacionada con la medida del CO_2 que se produce en el suelo debido a la actividad metabólica de los microorganismos (Montenegro, 2008). Los datos obtenidos en esta investigación a partir de los ensayos de respirometría realizados a las muestras de suelos de los sitios 1 y 2, mostraron un aumento de la actividad microbiana en las parcelas del sitio 2 que recibieron vinaza respecto al control, mientras que no hubo diferencias significativas en el sitio 1 entre las parcelas tratadas y la parcela control para ninguno de los momentos de muestreo. Los resultados del sitio 2 concuerdan con los reportados en otras investigaciones que también observaron un aumento de la actividad microbiana en suelos que recibieron vinaza (Prata *et al.*, 2001; Bustamante *et al.*, 2011). Este aumento puede deberse al suministro de energía y C que reciben los microorganismos quimiorganotróficos proveniente de la materia orgánica presente en la vinaza que es una fuente de C soluble y de fácil disponibilidad (Prata *et al.*, 2001). La mayor parte del C de la vinaza se encuentra en forma de glicerol procedente de las rutas alternativas de la fermentación en el proceso de producción de etanol; en las células el glicerol puede convertirse a dihidroxiacetona e incorporarse al metabolismo microbiano mediante la vía glicolítica (Rodella *et al.*, 1983; Lehninger, 2006).

En otros estudios donde se analizó el efecto del vertido de lodos provenientes del tratamiento de residuos de destilerías sobre suelos tropicales destinados a la agricultura, se observó un aumento inicial en la producción de CO₂ reflejando de este modo el incremento de la actividad microbiana: la mayor actividad se encontró entre 30 y 60 días después de la aplicación (casi 10 veces mayor en los suelos que recibieron lodo respecto a los que no recibieron) cuando se utilizó una dosis de 150 t/ha de lodos, constatándose luego una gradual disminución de la actividad con el paso del tiempo (Tripathi, 2011). En esta tesis los resultados obtenidos fueron similares para el suelo del sitio 2. La mayor actividad se registró entre 14 y 50 días luego de la aplicación de vinaza, principalmente en las parcelas que recibieron las dosis de vinaza de 450 y 150 m³/ha respecto a la parcela control; el efecto se prolongó hasta los 5 meses pero con valores inferiores a los observados anteriormente y con una tendencia a disminuir a medida que pasó el tiempo aproximándose a los valores de la parcela control.

Este trabajo de tesis fue llevado a cabo en el marco de un proyecto de vinculación ANCAP-UDELAR 2009 denominado “Determinación de los cambios físicos químicos y biológicos en suelos cultivados con caña de azúcar en Bella Unión por aplicación de vinaza”. En dicho proyecto se determinó también la abundancia de hongos filamentosos mediante recuento en placa y la biomasa microbiana utilizando el método de fumigación-extracción con cloroformo. Este método se basa en la diferencia entre el C extraído con K₂SO₄ 0,5 M de muestras de suelo fumigadas con cloroformo y no fumigadas (Vance *et al.*, 1987).

El C de la biomasa microbiana se relaciona con el C orgánico estableciéndose de este modo qué proporción de este último es inmovilizado por los microorganismos del suelo. La importancia de determinar el carbono de la biomasa microbiana se debe al rol que poseen los microorganismos del suelo en la retención y liberación de nutrientes y en la energía del sistema (Montenegro, 2008). La biomasa microbiana es un indicador muy importante de la composición microbiana del suelo, en especial cuando se combina con el parámetro de actividad medido por la producción de CO₂ (Montenegro *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en dicho proyecto muestran que el agregado de vinaza en el sitio 1 favoreció la proliferación de hongos filamentosos, efecto que se visualizó hasta los 13 meses luego de la aplicación de la misma; sin embargo no se observaron diferencias significativas en la biomasa microbiana medida por el método de fumigación-extracción entre las parcelas que recibieron vinaza y la parcela control, en ninguno de los muestreos realizados y para ninguno de los sitios estudiados (Loperena *et al.*, 2012). En el sitio 1 se constató un aumento en la biomasa microbiana debido al aumento significativo de las poblaciones de bacterias heterótrofas, actinobacterias y hongos filamentosos mientras que en la respiración no se observaron diferencias significativas. Por el contrario, en el sitio 2 se observó una tendencia inversa ya que el número de microorganismos no

tuvo un aumento significativo al aplicarse vinaza pero sí se detectaron diferencias significativas en la respiración. La función de los microorganismos es más eficiente cuanto mayor es la fracción de C del sustrato incorporado por la biomasa y menor el C perdido por la respiración (Insam, 1990). A su vez, si la alta actividad microbiana generada por la aplicación de materia orgánica, no se puede transformar en biomasa por falta de nutrientes esenciales como P, N, S entre otros micronutrientes, podría ocurrir la degradación de materia orgánica propia del suelo en un proceso conocido como “priming effect” (Bernal *et al.*, 1998a, 1998b). Se puede decir entonces que el efecto del agregado de materia orgánica será positivo si la microbiota aumenta debido al aporte de nutrientes provenientes de la misma o negativo si el crecimiento de la población microbiana se ve restringido por otros nutrientes u otras condiciones físico-químicas del suelo. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación en relación a la biomasa y la respiración nos estarían diciendo que la materia orgánica aportada por la vinaza fue mejor aprovechada por los microorganismos del suelo en el sitio 1 que en el sitio 2.

3. Caracterización de la diversidad bacteriana molecular en suelos con y sin vinaza

3.1. Cuantificación de bacterias totales por Real Time PCR (rt-PCR)

La reacción de PCR en tiempo real, debido al avance en el desarrollo de los fluoróforos, se ha convertido en una técnica emergente para la detección y cuantificación de microorganismos presentes en muestras ambientales (Zhang y Fang, 2006).

En este trabajo se cuantificó toda la población bacteriana (dominio *Bacteria*) existente en los suelos mediante el análisis del gen que codifica para el ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S). La abundancia de bacterias totales hallada no mostró diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los sitios estudiados ni en ninguno de los momentos de muestreo. Los valores obtenidos para el número total de bacterias se ubicaron entre 10^8 y 10^{10} número de copias del gen por gramo de suelo seco en ambos sitios cuando se analizaron las muestras tomadas en el momento inicial, a los 15 y 30 días y a los 5 meses luego de la aplicación de vinaza, mientras que a los 13 meses después del riego se pudo observar una disminución en la abundancia de bacterias totales en ambos tipos de suelo encontrándose en el rango de 10^6 - 10^7 y 10^7 - 10^8 número de copias por gramos de suelo seco para el sitio 1 y sitio 2, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados a partir de una investigación realizada respecto a la abundancia de bacterias totales en suelos utilizados para el cultivo de porotos en Canadá. En este trabajo se observó que la variación en la densidad de la población bacteriana total fue limitada y no mostró diferencias significativas en la mayoría de los momentos de muestreo entre muestras (Dandie *et.al.*, 2008). Los valores registrados para el número total de bacterias en dicho trabajo fueron inferiores a los

obtenidos en nuestra investigación en los primeros cuatro muestreos, pero similares a los hallados en el muestreo de los 13 meses puesto que se ubicaron entre 10^7 y 10^8 copias por gramo de suelo seco. Además, resultados similares a los encontrados en esta tesis han sido reportados por He *et al.* (2007) respecto a la cantidad de bacterias totales presentes en muestras de suelos, destinados a la agricultura, ubicados en la provincia de Hunan en el centro sur de China; en dicha investigación tampoco se hallaron cambios significativos en la densidad de bacterias totales en suelos tratados con diferentes fertilizantes en invierno y verano. Okano *et al.* (2004) midieron durante 28 días la población de bacterias totales presentes en suelos destinados al cultivo de tomate en respuesta a la aplicación de nitrato de amonio, y al igual que en nuestro trabajo, tampoco encontraron cambios significativos en la abundancia de las mismas; el tamaño de las poblaciones de bacterias totales permaneció entre $0,7 \times 10^9$ y $2,2 \times 10^9$ células por gramo de suelo seco independientemente de la concentración de amonio utilizada, encontrándose estos valores en el mismo orden que los registrados en esta tesis.

Como ya se mencionó anteriormente, a partir de los recuentos en placa y de los ensayos de NMP, se observó que ciertos grupos bacterianos registraron diferencias significativas respecto a su abundancia en algunos de los tratamientos y momentos de muestreo, mientras que la población de bacterias totales cuantificada mediante Real Time PCR no mostró cambios significativos a lo largo de la investigación. Estos resultados no deberían sorprender debido a que los grupos bacterianos que mostraron diferencias significativas representan una pequeña fracción de las poblaciones de bacterias totales presentes en los suelos.

3.2. Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana mediante PCR-DGGE

En este trabajo se analizó la estructura de la comunidad bacteriana de suelos característicos de Bella Unión (con y sin aplicación de vinaza) destinados al cultivo de caña de azúcar, amplificando por PCR regiones del gen del ARNr 16S y separando los fragmentos obtenidos por DGGE. La información que proporcionan los genes que codifican para el ARN ribosómico, en particular el gen que codifica para la subunidad menor del ribosoma bacteriano (ARNr 16S), ha permitido un gran avance en la descripción de los microorganismos presentes en muestras de suelos. Este marcador molecular posee ventajas como ser que se encuentra en todos los organismos y cumple la misma función en todos ellos, existen diferentes regiones de la molécula con diferente grado de variabilidad que permiten comparar su secuencia con distinto nivel de resolución, su transmisión es principalmente vertical, el tamaño de la secuencia es el adecuado para brindar información suficiente y los análisis de secuencias permiten realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos (Nogales, 2005). La técnica de DGGE permite obtener un perfil comparativo de muchas muestras facilitando así el análisis espacial y temporal de comunidades microbianas en

ecosistemas. Este método de fingerprinting permite separar moléculas con secuencias de bases distintas gracias a diferencias en sus propiedades de desnaturalización, que se reflejan en variaciones en la distancia de migración en gradientes químicos. En teoría, la DGGE puede separar moléculas que tengan únicamente un par de bases de diferencia en su secuencia (Nakatsu, 2007; Kirk *et al.*, 2004).

A partir del análisis de los resultados obtenidos de los ensayos de PCR-DGGE se observó una muy baja o indetectable variación en la estructura de las comunidades bacterianas intraparcela cuando se compararon 3 réplicas de cada una. Resultados similares han sido reportados a partir de datos obtenidos en estudios llevados a cabo en suelos de la Antártida donde se evaluó el efecto de la ubicación y de la vegetación sobre la estructura de la comunidad microbiana a partir de 5 réplicas por parcela (Yergeau *et al.*, 2007). Sin embargo, sí se detectaron diferencias en la estructura de las comunidades entre las parcelas, observándose claramente para todos los momentos de muestreo, tres grupos bien diferentes dependiendo del tratamiento aplicado.

Cuando se compararon las comunidades bacterianas entre las parcelas del sitio 1 se pudo observar, que para todos los momentos de muestreo, las comunidades de las parcelas 1 y 3 (que recibieron 450 m³/ha y 150 m³/ha de vinaza, respectivamente) se asemejaron más entre ellas que con la comunidad de la parcela 4 (control sin vinaza). Sin embargo, en el caso de las parcelas del sitio 2, se registró un comportamiento diferente entre las comunidades bacterianas ya que tanto en el muestreo previo a la aplicación de vinaza y en el de 50 días después, las comunidades bacterianas de las parcelas 7 y 8 (parcela que recibió 150 m³/ha de vinaza y parcela control, respectivamente) resultaron más similares agrupándose entre ellas y más alejadas de la comunidad de la parcela 5 (que recibió 450 m³/ha de vinaza).

En el muestreo previo a la aplicación de vinaza, las comunidades bacterianas de las parcelas 1 y 3 se agruparon mostrando una similitud del 53% entre ellas y del 47% con la comunidad presente en la parcela 4, evidenciando una heterogeneidad espacial en el suelo donde se instaló el ensayo. Luego de 18 días del riego, la similitud entre las comunidades bacterianas de las parcelas 1 y 3 aumentó a un 62%, lo que indicaría un efecto de la vinaza sobre las mismas, que presentaron una similitud del 50% con respecto a la comunidad de la parcela que no recibió tratamiento. Sin embargo, no podría afirmarse que la tendencia observada sea estadísticamente significativa. Al analizarse las muestras tomadas a los 33 días luego de la aplicación de vinaza, se observó una similitud del 61% entre las estructuras de las comunidades bacterianas de las parcelas 1 y 3, que a su vez se asemejaron a la comunidad de la parcela 4 en un 53%. Estos datos son semejantes a los obtenidos a partir de las muestras de los 18 días y podrían estar afirmando lo anteriormente discutido. Debido a que no se pudo continuar este análisis en los muestreos posteriores, no

podríamos saber si existió una tendencia a la recuperación de la estructura de la comunidad volviéndose más similar al control, como se observó para otras variables estudiadas.

La estructura de las comunidades bacterianas del sitio 2, desde el comienzo del ensayo, mostró patrones de similitud diferentes a los observados para las comunidades presentes en el sitio 1, pero también evidenciando una heterogeneidad espacial en el suelo. En el momento inicial, previo al tratamiento con vinaza, las comunidades de las parcelas 7 y 8 se agruparon con una similitud del 71% y a su vez éstas mostraron una similitud del 64% con la comunidad bacteriana presente en la parcela 5. Cuando se estudiaron los efectos de la vinaza sobre las comunidades bacterianas de este sitio luego de 50 días de aplicada la misma, se observó una disminución en la similitud tanto entre las comunidades de las parcelas 7 y 8 como entre el grupo que éstas formaron con la comunidad de la parcela 5. Para este momento de muestreo las comunidades bacterianas de las parcelas 7 y 8 mostraron una similitud del 61%, detectándose también un alejamiento de las comunidades de las parcelas 7 (recibió 150 m³/ha de vinaza) y 8 (parcela control) respecto a la comunidad de la parcela 5, que recibió 450 m³/ha de vinaza, ya que su porcentaje de similitud a los 50 días cayó al 41%. Estos resultados podrían estar indicando que las comunidades de las parcelas que recibieron alguna dosis de vinaza resultaron afectadas por la aplicación de la misma: las comunidades de las parcelas 7 y 8 que inicialmente mostraron una similitud del 71% se apartaron en un 10% luego del tratamiento evidenciándose una disminución de la similitud entre ellas. Lo mismo ocurrió con la comunidad de la parcela 5 respecto al grupo constituido por las comunidades de las parcelas 7 y 8, puesto que la similitud entre éstos disminuyó de 64% a 41%. El efecto de la vinaza sobre el sitio 2 se pudo visualizar con mayor claridad que en el sitio 1 ya que entre la parcela no tratada y la que recibió 150 m³/ha de vinaza se registró un descenso del 10% en la similitud de sus comunidades, y entre el grupo que éstas formaron y la parcela que recibió 450 m³/ha de vinaza el descenso fue aún mayor (23%). Estos resultados podrían estar sugiriendo que las comunidades bacterianas del sitio 2 poseen una baja resiliencia como característica debido a la disminución registrada en la similitud de las mismas en las parcelas que recibieron vinaza y la parcela no tratada. Sin embargo, no podría afirmarse que la tendencia observada sea estadísticamente significativa.

El comportamiento diferenciado que se observó entre las comunidades bacterianas de ambos sitios podría deberse a la diferente composición de los suelos que conforman los mismos, como ya se ha discutido para otras variables estudiadas en este trabajo.

4. Consideraciones finales

Debido a la gran complejidad que presenta la microbiota del suelo es necesario estudiar los cambios de la misma utilizando varios métodos a la vez, puesto que diferentes metodologías y enfoques nos pueden dar información sobre la ocurrencia de distintos fenómenos que están sucediendo. Un ejemplo son los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a las determinaciones de bacterias totales que indican que sobre la microbiota del suelo en su totalidad la vinaza no tuvo una incidencia significativa, mientras que sí la tuvo en la actividad microbiana y en algunos grupos de microorganismos como las actinobacterias, las bacterias heterótrofas y bacterias amonificantes (Tabla 21), que representan parte de la microbiota que es capaz de utilizar y degradar los nutrientes que la vinaza aporta.

La aplicación de vinaza, en cuanto a su aprovechamiento como mejorador del suelo, puede tener diferentes efectos según el tipo de suelo y condiciones en que se aplique. El efecto puede ser positivo, si su microbiota aumenta debido al aporte de nutrientes de la vinaza (posible situación del sitio 1) o negativo si el crecimiento poblacional está restringido por otros nutrientes o condición físico-química del suelo y solamente aumenta la respiración (posible situación en el sitio 2).

El seguimiento de la evolución de las poblaciones microbianas durante un año no es suficiente para detectar cambios acumulativos por aplicación sistemática de vinaza a lo largo de varios años. De acuerdo a la bibliografía y a los resultados de este trabajo, el efecto de la aplicación de vinaza en el suelo depende de la cantidad aplicada y su efecto varía en el tiempo.

Tabla 21. Resumen de los principales efectos causados por la vinaza sobre las variables microbianas analizadas en ambos sitios y cada muestreo.

VARIABLE	Efecto de la aplicación de vinaza respecto al control									
	SITIO 1					SITIO 2				
	18 días	33 días	5 meses	8 meses	13 meses ¹	14 días	50 días	5 meses	8 meses	13 meses
Heterótrofos	+	=	+	=	=	=	=	=	- (450)	=
Actinobacterias*	+	+	+	+	=	=	=	=	=	=
Amonificantes	=	+ (450)	=	nd	+ (450)	=	=	=	nd	=
Desnitrificantes	+	=	=	nd	=	=	=	+ (450)	nd	=
Nitritantes	=	=	=	nd	=	=	=	=	nd	=
Nitratantes	=	=	=	nd	+	- (450)	=	=	nd	=
Bacterias totales	=	=	=	nd	=	=	=	=	nd	=
Respiración	=	=	=	=	=	+	+	+	=	=

+: se observó un aumento en esta variable en las parcelas con aplicación de vinaza respecto al control.

- : se observó una disminución en esta variable en las parcelas con aplicación de vinaza respecto al control.

=: no se observaron diferencias significativas en las parcelas con vinaza respecto al control.

* Esta variable presentó diferencias entre las parcelas a tiempo 0. Las mismas fueron consideradas para la comparación entre tratamientos en los muestreos posteriores.

Cuando el efecto se observó de forma significativa sólo para una concentración de vinaza aplicada, la misma se indica entre paréntesis.

nd: no determinado

¹ Antes de este muestreo se regaron con vinaza todas las parcelas de este sitio.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron diferentes efectos de la aplicación de vinaza sobre la microbiota del suelo, dependiendo de la población estudiada y del tipo de suelo.

En el sitio 1 la vinaza promovió el aumento de bacterias cultivables heterótrofas, actinobacterias y bacterias amonificantes.

En el sitio 2 la vinaza aumentó la actividad microbiana.

La estructura de la comunidad bacteriana fue afectada en ambos sitios, principalmente en el sitio 2.

Cuando se observaron cambios significativos en los procesos biológicos como consecuencia de la aplicación de vinaza, los efectos fueron temporales y más acentuados con la mayor dosis de vinaza. Dependiendo de la variable analizada los cambios se observaron hasta 5 u 8 meses luego de la aplicación. En algunos casos se volvieron a detectar cambios luego del riego extra con vinaza en el sitio 1, lo que podría estar indicando un efecto acumulativo.

Las conclusiones de este trabajo son válidas para los suelos estudiados (L1 y B1) y en las condiciones en que se aplicó la vinaza (única dosis de 150, 300 y 450 m³/ha previo al cultivo de la caña de azúcar) y no pueden ser generalizadas a otros suelos de la región ni a otras condiciones de aplicación.

PERSPECTIVAS

Continuar el análisis por DGGE en los muestreos posteriores, para saber si existió una tendencia a la recuperación de la estructura de la comunidad volviéndose más similar al control, como se observó para otras variables estudiadas.

A partir de los datos obtenidos mediante el análisis por PCR-DGGE del gen del ARNr 16S del dominio *Bacteria*, se calcularán índices, como el valor de impacto sobre la diversidad microbiana (IDM), para poder obtener una medida de cuánto difiere la estructura de la comunidad bacteriana de los suelos tratados con alguna dosis de vinaza respecto al suelo que no recibió tratamiento.

Se realizarán también análisis multivariados para conocer la incidencia de las diferentes variables (físicoquímicas, microbiológicas, tratamientos y tiempo) y la variabilidad del sistema.

Se estudiarán los efectos sobre la comunidad microbiana a partir de la aplicación directa de vinaza una vez al año, durante un período de 3 años, y se evaluarán entonces los cambios por acumulación de la misma.

ANEXO

1. MEDIOS DE CULTIVO

1.1 Tryptic Soy Agar 1/10 (TSA 1/10)

(Smit *et al.*, 2001)

TSB	3 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p

1.2 Starch Casein Agar (SCA)

(Leoni y Ghini, 2003)

Almidón	10 g
Caseína	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	16 g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p

1.3 Medio para detección de bacterias amonificantes

(Seeley *et al.*, 1991)

Peptona	40 g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p

1.4 Medio para detección de bacterias nitritantes(Seeley *et al.*, 1991)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,02 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,73 g
CaCO ₃	5 g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p

1.5 Medio para detección de bacterias nitratantes(Seeley *et al.*, 1991)

NaNO ₂	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Na ₂ CO ₃	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,59 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,73 g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p

1.6 Medio para detección de bacterias desnitrificantes(Seeley *et al.*, 1991)

Nutrien Broth	13 g
KNO ₃	5 g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p

2. SOLUCIONES

2.1 Pirofosfato de Sodio

Pirofosfato de Sodio decahidratado	1,68 g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p

Se llevó el pH a 7 con HCl 10 N

2.2 Soluciones para DGGE

2.2.1 EDTA 0.5M pH 8.0

EDTA 2H ₂ O	18.6g
NaOH	hasta pH 8
Agua ultra pura	100 ml c.s.p.

Se agregó EDTA a 70ml de H₂O ultra pura. Se agitó y agregó NaOH hasta alcanzar pH 8. Se completó el volumen a 100 ml. Se guardó a temperatura ambiente.

2.2.2 Buffer TAE 50X

Tris-Base	60.5g
Ácido acético glacial	14.28ml
Sol. EDTA 0.5M pH8.0	25ml
Agua ultra pura	250 ml c.s.p.

Se agregó Tris-Base a 150 ml de agua ultra pura. Se agitó y agregó ácido acético glacial y EDTA. Después de solubilizar se completó el volumen a 250 ml. Se autoclavó 20 minutos. Se guardó a temperatura ambiente.

2.2.3 Formamida desionizada

Resina Ag-501-X8 (BIORAD)	5g
Formamida	100 ml

Se mezcló y agitó aproximadamente durante 1 hora. Se filtró con papel Whatman (cualitativo N^o.4). Se guardó a temperatura ambiente.

2.2.4 Acrilamida 40%

Acrilamida	38.93g
Bisacrilamida	1.07g
Agua ultra pura	100 ml c.s.p.

Se disolvió la acrilamida en 30 ml de agua ultra pura. Se Agregó lentamente la bisacrilamida agitando. Se completó el volumen a 100 ml. Se filtró con membrana Millipore 0.45 μ M. Se guardó a 4°C (sin luz).

2.2.5 Solución 0% de desnaturizante (6% acrilamida)

Acrilamida 40%	15ml
Buffer TAE 50X	2ml
Agua ultra pura	83 ml

Se mezcló acrilamida 40% con TAE 50X y el volumen se completó con agua ultra pura. Se filtró con membrana Millipore 0.45 μ M. Se guardó a 4°C sin luz (hasta 1 mes).

2.2.6 Solución 70% desnaturizante (6% acrilamida)

Acrilamida 40%	15 ml
Buffer TAE 50X	2 ml
Formamida desionizada	28 ml
Urea	29,4 g
Agua ultra pura	100 ml c.s.p.

Se mezcló urea, formamida, buffer TAE 50X y acrilamida. Se agitó aproximadamente durante 40 minutos hasta que se disolvió la urea. Se completó el volumen a 100 ml con agua ultra pura. Se filtró con membrana Millipore 0.45 μ M y se guardó a 4°C por un mes.

2.2.7 Persulfato de Amonio (APS) 10%

Persulfato de amonio	0.1g
Agua ultra pura	1ml

Se homogeneizó y se guardó a -20°C como máximo por 1 semana.

2.2.8 Colorante (D code DYE solution)

Azul de bromofenol	0.05g
Xilencianol	0.05g
Buffer TAE 1X	10ml

Los colorantes fueron disueltos en 10ml de TAE 1X. Se guardó a temperatura ambiente.

2.2.9 Colorante (2X gel loading DYE)

Azul de bromofenol	0.005g
Xilencianol	0.005g
Glicerol 100%	7 ml
Agua ultra pura	3 ml

Se agregaron los colorantes al agua y luego se agregó el glicerol. Se guardó a temperatura ambiente.

2.3 Reactivo de Nessler**Solución A**

Ioduro de Potasio	35 g
Ioduro de Mercurio	50 g
Agua destilada	200 ml

Solución B

NaOH	50 g
Agua destilada	250 ml

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

3. CEBADORES

F968 - GC	5' - CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC -3'	Heuer <i>et al.</i> , 1997
R1378	5' - CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG -3'	Heuer <i>et al.</i> , 1997
Ba519f	5' - CAG CMG CCG CGG TAA NWC -3'	Lueders <i>et al.</i> , 2004
Ba907r	5' - CCG TCA ATT CMT TTR AGT T -3'	Lueders <i>et al.</i> , 2004

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALUR. 2012. <http://www.alur.com.uy/ley18195.html>

Amorim H.V., Lopes M.L., Velasco de Castro Oliveira J., Buckeridge M.S., y Goldman G.H. (2011). Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **91**: 1267–1275.

Araújo W.L., Marcon J., Maccheroni W. Jr., van Elsas J.D., van Vuurde J.W.L., y Azevedo J.L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 4906–4914.

Bajsa N. (2008). Efecto del pastoreo bovino sobre la comunidad bacteriana en un suelo de pradera natural. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias – UDELAR.

Bebé F.V., Rolim M.M., Pedrosa E.M.R., Silva G.B., Oliveira V.S. (2009). Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. **13**: 781–787.

Berg L.R. (2008). *Introductory Botany: Plants, People, and the Environment*. 2nd edition. Thomson Higher Education, Belmont, USA. p.533.

Bernal M.P., Navarro A.F., Sánchez-Monedero M.A., Roig A., y Cegarra J. (1998a). Influence of sewage sludge compost stability and maturity on carbon and nitrogen mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **30**: 305-313.

Bernal M.P., Sánchez-Monedero M.A., Paredes C., y Roig A. (1998b). Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **69**: 175-189.

Braga Do Carmo J., Filoso S., Zotelli L.C., de Sousa Neto E.R., Pitombo L.M., Duarte-Neto P.J., Vargas V.P., Andrade C.A., Gava G.J.C., Rossetto R., Cantarella H., Neto A., y Martinelli L.A. (2012). Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. *Global Change Biology Bioenergy*. doi: 10.1111/j.1757-1707.2012.01199.x

Brons J.K., y van Elsas J.D. (2008). Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**: 2717–2727.

Bustamante M.A., Said-Pullicino D., Agulló E., Andreu J., Paredes C., y Moral R. (2011). Application of winery and distillery waste composts to a Jumilla (SE

- Spain) vineyard: Effects on the characteristics of a calcareous sandy-loam soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **140**: 80–87.
- Bustamante M.A., Said-Pullicino D., Paredes C., Cecilia J.A., y Moral R.** (2010). Influences of winery–distillery waste compost stability and soil type on soil carbon dynamics in amended soils. *Waste Management*. **30**: 1966–1975.
- Bustin S.A., y Nolan T.** (2004). Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR. En: *Real-Time PCR, An Essential Guide*, chapter 7: 125-184. Edwards K., Logan J., y Saunders N. (eds). Horzone Bioscience, ISBN: 0-9545232-7-X.
- Carrillo L.** (2003). *Microbiología agrícola*. Universidad Nacional de Salta.
- Cayuela M. L., Oenema O., Kuikman P. J., Bakker R. R. J. W., y van Groenigen J. W.** (2010). Bioenergy by-products as soil amendments? Implications for carbon sequestration and greenhouse gas emissions. *Global Change Biology Bioenergy*. **2**: 201–213; doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01055.x
- Chao W.L., Tu H.J., y Chao C.C.** (1996). Nitrogen transformations in tropical soils under conventional and sustainable farming systems. *Biology and Fertility of Soils*. **21**: 252-256.
- Chèneby D., Philippot L., Hartmann A., Hénault C., y Germon J-C.** (2000). 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*. **34**: 121-128.
- Có Júnior C., Marques M.O., Tasso Júnior L.C.** (2008). Efeito residual de quatro aplicações anuais de lodo de esgoto e vinhaça na qualidade tecnológica da cana de açúcar. *Revista Engenharia Agrícola, Jaboticabal*. **28**: 196-203.
- Dandie C.E., Burton D.L., Zebarth B.J., Henderson S.L., Trevors J.T., y Goyer C.** (2008). Changes in bacterial denitrifier community abundance over time in an agricultural field and their relationship with denitrification activity. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**: 5997–6005.
- de Oliveira E.L., Andrade L.A de B., de Faria M.A., y Custódio T.N.** (2009). Vinhaça de alambique e nitrogênio na cana-de-açúcar, em ambiente irrigado e não irrigado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. **13**: 694-699.
- Ding G-C., Piceno Y.M., Heuer H., Weinert N., Dohrmann A.B., Carrillo A., Andersen G.L., Castellanos T., Tebbe C.C., y Smalla K.** (2013). Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semi-arid ecosystem. *PLoS ONE* **8**(3): e59497. doi:10.1371/journal.pone.0059497
- Drazkiewicz M.** (1996). Ammonification in soil aggregates: effect of some physical, physico-chemical and chemical properties. *Folia Microbiol.* **41**: 419-422.

- Ellis R.J., Morgan P., Weightman A.J. y Fry L.C.** (2003). Cultivation-dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 3223-3230.
- Errea E., y Méndez I.** (2011). Azúcar: Cultivo de caña y producción industrial. Trabajos especiales, N° 303 (MGAP).
- España-Gamboa E.I., Mijangos-Cortés J.V., Hernández-Zárate G., Domínguez Maldonado J.A., y Alzate-Gaviria L.M.** (2012). Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. *Biotechnology for Biofuels*. **5**:82.
- Fassbender H.W., y Bornemisza E.** (1987). Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. 2ª edición, p.62. IICA, San José, Costa Rica.
- Fernández L.A., Bedmar E.J., Sagardoy M.A., Delgado M.J., y Gómez M.A.** (2011). Denitrification Activity in Soils for Sustainable Agriculture. En: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. Maheshwari D.K. (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Francis C.A., Beman J.M., y Kuypers M.M.** (2007). New processes and players in the nitrógeno cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *International Society for Microbial Ecology*. **1**: 19–27.
- Frioni L.** (2006). Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Uruguay.
- Galvez A., Sinicco T., Cayuela M.L., Mingorance M.D., Fornasier F., y Mondini C.** (2012). Short term effects of bioenergy by-products on soil C and N dynamics, nutrient availability and biochemical properties. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **160**: 3– 14.
- García A., y Rojas C.** Producción de alcohol carburante y uso de sus subproductos en agricultura. XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Quito, 29 - 31 octubre de 2008.
- Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M, y Ball A.S.** (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 1800–1809.
- Gonçalves de Oliveira B., Nunes Carvalho J.L, Pellegrino Cerri C.E., Clemente Cerri C., y Feigl B.J.** (2013). Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. *Geoderma*. **200–201**: 77–84.
- González V., y Pomares F.** (2008). La fertilización y el balance de nutrientes en sistemas agroecológicos. Sociedad española de agricultura ecológica, Catarroja (Valencia).

- Hamdali H., Hafidi M., Virolle M.J., y Ouhdouch Y.** (2008). Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**: 2565–2575.
- He Ji-zheng, Shen Ju-pei, Zhang Li-mei, Zhu Yong-guan, Zheng Yuan-ming, Xu Ming-gang, y Di Hongjie.** (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*. **9**: 2364–2374.
- Hernández Melchor G.I., Salgado García S., Palma López D.J., Lagunes Espinoza L., Castelán Estrada M. y Ruiz Rosado O.** (2008). Vinaza y composta de cachaza como fuente de nutrientes en caña de azúcar en un gleysol mólico de Chiapas, México. *Interciencia*. **33**: 855-860.
- Heuer, H., Krsek M., Baker P., Smalla K. y Wellington E.M.H.** (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 3233-3241.
- Hunter-Cevera, J.C.** (1998). The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*. **1**: 278-285.
- Insam H.** (1990) Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by the climatic regime?. *Soil Biology and Biochemistry*. **22**: 525-532.
- Kandeler E., Eder G., y Sobotik M.** (1994). Microbial biomass, N mineralization, and the activities of various enzymes in relation to nitrate leaching and root distribution in a slurry-amended grassland. *Biology and Fertility of Soils*. **18**: 7-12.
- Kennedy A.C.** (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **74**: 65-76.
- Kennedy A.C., y Smith K.L.** (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*. **170**: 75-86.
- Kim J., Lim J., y Lee C.** (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnology Advances*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010>
- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., y Trevors J.T.** (2004). Methods for study soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. **58**: 169-188.
- Korndörfer G.H.** (2007). Valor fertilizante da vinhaça para caña de açúcar. Universidade Federal Uberlandia, Brasil.

- Korndörfer G.H., Nolla A., y Gama A.J.M.** (2010). Manejo, aplicación y valor fertilizante de la vinaza para caña de azúcar y otros cultivos. *Tecnicaña*. **24**: 23-28.
- Kuske C.R., Ticknor L.O., Miller M.E., Dunbar J.M., Davis J.A., Barns S.M. y Belnap J.** (2002). Comparison of soil bacterial communities in the rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 1854-1863.
- Lambais M.R., de Carvalho Cury J., Maluche-Baretta C.R., y de Campos Büll R.** (2005). Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. *Tópicos em Ciência do Solo*. **4**: 43-84.
- Lehninger.** (2006). *Principios de Bioquímica*, 4ª ed. Nelson, D.L. y Cox, M.M. Omega.
- 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.
- Loperena L., Musso M., Saravia V., Bajsa N., Senatore D., Pereira S., Fernández P., Fajardo L., Betucci L., y Lupo S.** (2012). Determinación de los cambios físicos químicos y biológicos en suelos cultivados con caña de azúcar en Bella Unión por aplicación de vinaza. Informe final del proyecto de vinculación ANCAP-Udelar 2009.
- Lopes E.S., Perón S.C., Portucal E.P., y Giordini A.R.** (1986). Efeito residual da vinhaça na população autóctone de *Rhizobium* do solo. *Bragantia*, Campinas. **45**: 29-36.
- Lorenz P., Liebeton K., Niehaus F., y Eck J.** (2002). Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion in Biotechnology*. **13**: 572–577.
- Lueders T., Manefield M., Friedrich M.W.** (2004). Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology*. **6**: 73-78.
- Machado Jr, G.R.** (2007). *Vinaza: características, usos y manejo*. I Feria Energética, Ciudad Guatemala.
- Meng Y., Tang Q., Liu Z., Chen G., Wang Y., y Tan Y.** (2009). Effects of filter mud and vinasse from sugar factory on quantity of soil microorganism in sugarcane field. *Guangxi Agricultural Sciences*. Vol 40. Nº 10. doi: CNKI:SUN:GXNY.0.2009-10-013.
- Miao V., y Davies J.** (2010). Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. *Antonie van Leeuwenhoek*, **98**: 143–150.

- Mohana S., Acharya B.K., y Madamwar D.** (2009). Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials*. **163**: 12–25.
- Montenegro Gómez S.P., Menjivar Flórez J.C., Bonilla Correa C.R., Madriñan Molina R.** (2009). Influencia de la aplicación de vinaza en actividad y biomasa microbiana en un Entic Dystropept y un Fluventic Haplustoll del Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica*, **48**: 41-45.
- Montenegro S.P.** (2008). Influencia de la aplicación de vinaza sobre la presencia, actividad y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de maíz dulce (*Zea Mays*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia.
- Murphy D.V., Stockdale E.A., Brookes P.C., y Goulding K.W.T.** (2007). Impact of microorganisms on chemical transformations in soil. En: *Soil biological fertility - A key to sustainable land use in agriculture*. L.K. Abbott y D.V. Murphy (eds). Springer, 37-59.
- Muyzer G., de Waal E.C., y Uitterlinden A.G.** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. **59**: 695–700.
- Nakatsu C.H.** (2007). Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America*. **71**:562–571. doi:10.2136/sssaj2006.0080
- Navarro A.R., Sepulveda M. del C., y Rubio M.C.** (2000). Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management*. **20**: 581-585.
- NCBI** 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nogales B.** (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. **14**: 41-51.
- Okano Y., Hristova K.R., Leutenegger C.M., Jackson L.E., Denison R.F., Gebreyesus B., Lebauer D., y Scow K.M.** (2004). Application of real-time pcr to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 1008–1016.
- Orlando Fo J.** (1983). Sistemas de aplicação de vinhaça em cana de açúcar. *Alcohol e Açúcar, Sao Paulo*. **1**: 28-32.
- Osanai Y., Flittner A., Janes J.K., Theobald P., Pendall E., Newton P.C.D., y Hovenden M.J.** (2011). Decomposition and nitrogen transformation rates in a

temperate grassland vary among co-occurring plant species. *Plant and Soil*. **350**: 365–378 .

- Øvreås L., y Torsvik V.V.** (1998). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*. **36**: 303-315.
- Papen H., y von Berg R.** (1998). A Most Probable Number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant and Soil*. **199**: 123–130.
- Passarin A.L., Rodrigues E.L., Pazzotti Robaina C.R., de Conti Medina C.** (2007). Evaluation of aggregate stability in an oxisol treated with different vinasse doses. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. **31**: 1255-1260.
- Paul A.E.** (2007). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic Press, 3^{era} Edición.
- Peixoto R.S., da C. Coutinho H.L., Rumjanek N.G., Macrae A., y Rosado A.S.** (2002). Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*. **35**: 316–320.
- Perera J.G H., Van der Werff D L., Gutiérrez Salamanca R.M.** (2008). Destilerías de alcohol de melaza con efluente cero y ganancia energética, mediante la concentración y combustión de vinazas. En: *Biocombustível para o Mercosul: edição 2008 do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia – Brasília: UNESCO, MBC, RECyT/Mercosul, CNPq, Petrobras*, p. 161.
- Philippot L., y Germon J.C.** (2005). Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. En: *Soil Biology, Volume 3. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. F. Buscot y A. Varma (eds). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 159-176.
- Prata F., Lavorenti A., Borges Regitano J., y Tornisielo V.L.** (2001). Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de Bianca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **36**: 975-981.
- Rodella A.A., Zambello Júnior E., y Orlando Filho J.** (1983) Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminum content. In: *Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Universidad de La Habana. Proceedings* 189-214.
- Rodríguez-Moreno N., Toro-Lozano C., Martínez-Salgado M., y Mercado-Reyes M.** (2007). Estandarización de condiciones para la prueba cuantitativa del NMP con bacterias nitrificantes y denitrificantes usando como matriz compost. *Universitas Scientiarum, Bogotá-Colombia*. **12**: 69-81.

- Rondon M.R., Goodman R.M., y Handelsman J.** (1999). The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology*. **17**: 403-409.
- Sambrook J., Fritsch E.F., y Maniatis T.** (1987). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanomiya L.T., Assis L.C., de Oliveira J.A., y Nahas, E.** (2006). Mineralización de la paja de caña de azúcar en suelo adicionado con viñaza (subproducto de la industria del alcohol de caña de azúcar) y fertilizante nitrogenado. *Agricultura Técnica (Chile)*. **66**: 90-97.
- Satyawali Y., y Balakrishnan M.** (2008). Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of Environmental Management*. **86**: 481–497.
- 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. 4^{ta} Edición, p. 389-391.
- Shukla S.K., Yadav R.L., Suman A., y Singh P.N.** (2008). Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. *Soil & Tillage Research*. **99**: 158–168.
- Smalla K., Oros-Sichler M., Milling A., Heuer H., Baumgarte S., Becker R., Neuber G., Kropf S., Ulrich A., Tebbe C.C.** (2007). Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results?. *Journal of Microbiological Methods*. **69**: 470–479.
- Smit E., Leeflansg P., Gommans S., van den Broek J., van Mil S., y 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.
- Sparling G.P. y West A.W.** (1990). A comparison of gas chromatography and differential respirometer methods to measure soil respiration and to estimate the soil microbial biomass. *Pedobiologia*. **34**: 103-112.
- Stackebrandt E.C., Sproer F., Rainey A., Burghardt J., Pauker O. y Hippe H.** (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47**: 1134–1139.
- Stackebrandt S. P.** (2000). *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. Springer-Verlag, New York, NY.

- Tejada M. y Gonzalez J.L.** 2005. Beet vinasse applied to wheat under dryland conditions affects soil properties and yield. *European Journal of Agronomy*. **23**: 336–347.
- Tripathi B.D.** (2011). A short term study on toxic effects of distillery sludge amendment on microbiological and enzymatic properties of agricultural soil in a tropical city. *Journal of Earth Science and Climate Change*. **1**:106. doi:10.4172/2157-7617.1000106.
- Valdes A.** (2007). Los residuales líquidos de la producción del alcohol. Taller gestão de energia e residuos na agroindústria socroalcoholeira. Red temática IVH. Empleo de la biomasa azucarera como fuente de alimento energía, derivados y su relación con la preservación del medio ambiente (BAZDREAM). Pirassununga, Brasil.
- Vance E.D., Brookes P.C., y Jenkinson D.** (1987). An extraction method for measuring microbial biomass carbon. *Soil Biology and Biochemistry*. **19**:703-707.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F, y van Sinderen D.** (2007). Genomics of actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **70**: 495–548.
- Vieites J.M., Guazzaroni M.E., Beloqui A., Golyshin P.N., y Ferrer M.** (2009). Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. **33**: 236–255.
- Ward B.B., Capone D.G., y Zehr J.P.** (2007). What's New in the Nitrogen Cycle?. *Oceanography*. **20**: 101-109.
- Wessén E. y Hallin S.** (2011). Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers—Possible bioindicator for soil monitoring. *Ecological Indicators*. **11**: 1696–1698.
- Yergeau E., Bokhorst S., Huiskes A.H.L., Boschker H.T.S., Aerts R. y Kowalchuk G.A.** (2007). Size and structure of bacterial, fungal and nematode communities along an Antarctic environmental gradient. *FEMS Microbiology Ecology*. **59**: 436–451.
- Zhang T. y Fang H.H. P.** (2006). Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **70**: 281–289.
- Zitz U., Domig K. J., Hoehl A., Weiss H., Wilrich P-Th., 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**: 299–309.