

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**(Opción Microbiología)**

**Bacterias promotoras del crecimiento  
vegetal en suelos con rotación de cultivos**

**NATALIA BAJSA**

**Directora de Tesis: ALICIA ARIAS**

**TRIBUNAL: Jorge Monza**

**Lina Bettucci**

**Silvia Batista**

**PEDECIBA – 2015**

**Montevideo, Uruguay**

**Esta Tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (MEC).**

**Algunos análisis fueron realizados durante una pasantía en el Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular, Instituto de Microbiología Profesor Paulo de Góes, Universidad Federal de Rio de Janeiro y el Laboratorio de Ecología de Suelos, EMBRAPA Suelos, Rio de Janeiro, Brasil.**

## AGRADECIMIENTOS

Al PEDECIBA y al IIBCE (MEC) por proporcionar el marco para la realización de esta tesis.

Al Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular de la UFRJ y al Laboratorio de Ecología de Suelos de EMBRAPA Suelos (Brasil) por recibirme para realizar una pasantía, en especial a Alexandre S. Rosado y Heitor da C. Coutinho (“el santo”).

A las agencias que otorgaron financiación para la ejecución de esta tesis: ANII, DICYT, PEDECIBA, UNU-BIOLAC.

A INIA por permitir el acceso a los ensayos estudiados en esta tesis, principalmente a través de Nora Altier, José Terra y Stella Zerbino.

A los integrantes del tribunal por sus valiosos aportes: Jorge, Lina y Silvia.

A Nora por su orientación ante la ANII y sus aportes a esta tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE por estar en el día a día, y por ser cómo son; muy en especial:

A Alicia por su orientación, compañía, hospitalidad, etc., etc., etc.

A Gastón y Tandis que trabajaron mucho en los muestreos, puesta a punto de técnicas, análisis de muestras y datos, etc., etc., etc.

A la Letty, Lis y Patz, por estar antes y ahora.

A Dani y Pablo por incorporarse a esta línea de trabajo con gran compromiso.

A Claudia por sus aportes a la presentación.

A todo el Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas.

A Ceci por su gran ayuda en todas las etapas, incluida la escrita (que costó pero salió), con constancia y confianza. A Majo, Sandra, Me y Flor, compañeras de esta larga carrera. A Gastón por inaugurar el término “Doc” y por el índice. A toda mi familia por su apoyo: la abu, mis padres, Seba, mi madrina, las primas, las nuevas sobris.

... MUCHAS GRACIAS

# ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	3
2.1	Sistemas de producción agrícola en Uruguay.....	5
2.2	Beneficios de la rotación de cultivos.....	6
2.3	Microorganismos del suelo.....	9
2.4	Microorganismos promotores del crecimiento vegetal.....	11
2.5	Diversidad microbiana.....	13
2.6	Métodos para el estudio de la diversidad microbiana.....	15
2.7	Efectos de las prácticas agrícolas sobre las comunidades microbianas del suelo.....	19
2.8	Experimentos de larga duración de rotaciones cultivos.....	25
2.9	ANTECEDENTES.....	26
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
3.1	HIPÓTESIS.....	28
3.2	OBJETIVOS.....	28
3.2.1	OBJETIVO GENERAL.....	28
3.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1	Descripción de los ensayos.....	29
4.1.1	Estación Experimental INIA - La Estanzuela, Colonia.....	29
4.1.2	Estación Experimental Palo a Pique, INIA - Treinta y Tres.....	30
4.2	Obtención de muestras de suelo.....	32
4.3	Recuentos bacterianos.....	34
3.3.1	Humedad.....	35
4.4	Análisis molecular.....	35
3.4.1	Extracción de ADN.....	36
3.4.2	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	36
3.4.3	DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....	39
4.5	Análisis fisicoquímicos de suelo.....	40
4.6	Análisis de datos.....	41
3.6.1	Recuentos bacterianos.....	41
3.6.2	DGGE.....	42
3.6.3	Cálculo de índices de diversidad.....	42
3.6.4	Análisis multivariados.....	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	Abundancia de poblaciones bacterianas cultivables en suelo.....	44
5.1.1	Ensayo INIA - La Estanzuela.....	44
5.1.2	Ensayo INIA - Treinta y Tres.....	49
5.2	Estructura de comunidades bacterianas en suelo.....	53
5.2.1	Diversidad del dominio Bacteria.....	54
5.2.2	Diversidad del género <i>Pseudomonas</i> .....	60
5.2.3	Diversidad del género <i>Bacillus</i> spp. y el filo <i>Actinobacteria</i> .....	62
5.2.4	Diversidad de las bacterias fijadoras de nitrógeno.....	64
5.3	Relaciones entre variables microbiológicas, físicas y químicas del suelo.....	69
6	DISCUSIÓN.....	77
6.1	Efecto de las rotaciones de cultivos sobre la abundancia bacteriana.....	77
6.2	Efecto de las rotaciones de cultivos sobre la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas.....	83

6.3	Efecto de los tratamientos agrícolas sobre otras propiedades del suelo ....	88
6.4	Efecto de diferentes prácticas agrícolas sobre las comunidades microbianas del suelo.....	91
6.5	Efecto de la especie vegetal sobre las comunidades bacterianas.....	93
6.6	Efecto de la estación de muestreo sobre las comunidades microbianas del suelo .....	94
6.7	Variabilidad metodológica en los estudios de las comunidades microbianas del suelo.....	97
6.8	Conclusiones y consideraciones finales.....	99
7	REFERENCIAS .....	102

## 1 RESUMEN

La rotación de cultivos y la siembra directa son prácticas agrícolas que han sido adoptadas por los productores uruguayos como alternativas más sustentables a las prácticas tradicionales, debido a sus efectos positivos sobre la productividad, el control de patógenos y la conservación de propiedades del suelo. Sin embargo, poco se sabe acerca del impacto de estas prácticas de manejo sobre las comunidades microbianas del suelo, a pesar de que los procesos mediados por ellas son esenciales para la productividad y estabilidad de los agroecosistemas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de la rotación de cultivos de granos con pasturas sobre las comunidades bacterianas del suelo, con énfasis en las que tienen potencial como promotoras del crecimiento vegetal. Se estudiaron dos ensayos de larga duración ubicados en estaciones experimentales de INIA, donde se evalúan sistemas agrícolas con diferentes intensidades de uso del suelo en siembra directa (INIA-Treinta y Tres) o con laboreo convencional (INIA-La Estanzuela). Se tomaron muestras de suelo en otoño y primavera, durante 2 años y se analizaron las poblaciones de bacterias cultivables por técnicas de recuento (heterótrofas, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp., actinobacterias y fijadoras de N<sub>2</sub> en vida libre), así como la estructura de la comunidad bacteriana total y de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> por una técnica independiente de cultivo.

En general, en ambos ensayos se observó una mayor abundancia de bacterias en las rotaciones con mayor proporción de pasturas. En el ensayo de INIA-La Estanzuela, la introducción de pasturas aumentó ciertas poblaciones bacterianas, igual o más que la fertilización química. En el ensayo de INIA-Treinta y Tres, los tratamientos de rotaciones presentaron una abundancia bacteriana mayor o similar que en el cultivo continuo de granos, pero menor que en el mejoramiento permanente de pasturas. Las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre se vieron favorecidas con la presencia de pasturas y fertilización, mientras que las *Pseudomonas* fluorescentes y los *Bacillus* spp. mostraron poca respuesta al tratamiento agrícola. La población de actinobacterias fue la más sensible a cambios en la intensidad de uso agrícola, aumentando con la presencia de pasturas en la rotación.

La estructura de la comunidad bacteriana presente en las muestras de suelo se

analizó por DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante) de un fragmento del gen del ARNr 16S. El análisis del dominio *Bacteria* mostró diferencias en la estructura de la comunidad con el tratamiento agrícola. En el ensayo de INIA-La Estanzuela la comunidad bacteriana bajo rotación fue diferente que bajo cultivo continuo, mientras que en INIA-Treinta y Tres dependió de la estación de muestreo analizada. A partir de los resultados de DGGE se determinaron índices de diversidad. En INIA-La Estanzuela la diversidad bacteriana fue menor en la rotación y en el cultivo continuo con fertilizantes respecto al cultivo continuo sin fertilizantes. En INIA-Treinta y Tres la diversidad en la rotación fue mayor que bajo cultivo continuo, pero menor que en mejoramiento permanente o campo natural. Se analizó también la estructura de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno por DGGE de un fragmento del gen *nifH* que codifica para la enzima nitrogenasa. En INIA-La Estanzuela se observaron diferencias en dicha comunidad entre los sistemas de rotación y los de cultivo continuo, mientras que en INIA-Treinta y Tres no se encontraron diferencias relacionadas al tratamiento agrícola.

Se analizaron las relaciones entre las variables microbiológicas y fisicoquímicas del suelo mediante análisis multivariados. En el ensayo de INIA-La Estanzuela las muestras de cultivo continuo se diferenciaron de las de rotaciones, estando la variable pH más asociada al cultivo continuo sin fertilizantes y la presencia de bacterias y nutrientes a las rotaciones. En INIA-Treinta y Tres las parcelas de campo natural y mejoramiento permanente se diferenciaron de los otros tratamientos, presentando mayores valores de pH, poblaciones bacterianas y nutrientes, con excepción del fósforo disponible que se asoció principalmente al cultivo continuo.

Se confirmó la hipótesis planteada: la rotación de cultivos de granos con pasturas modifica la estructura de las comunidades de bacterias del suelo promotoras del crecimiento vegetal, alterando su abundancia y diversidad. Los resultados de este trabajo aportan conocimiento sobre las bacterias presentes en suelos uruguayos y contribuyen al manejo sustentable de cultivos, promoviendo sistemas de producción que potencien las funciones de los microorganismos, presenten menor impacto sobre el suelo y favorezcan su conservación.

**PALABRAS CLAVE:** comunidad bacteriana, diversidad, rotaciones cultivo-pasturas, experimentos de larga duración.

## 2 INTRODUCCIÓN

El suelo es un recurso no renovable a escala humana, y su funcionamiento no sólo es importante en la producción de alimentos y fibras sino que también lo es en el mantenimiento local, regional y global de la calidad ambiental (Doran & Zeiss 2000). La toma de conciencia de esta situación ha aumentado el interés por evaluar la sustentabilidad de las prácticas agrícolas y la calidad del suelo asociada a las mismas.

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). 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 (Bustamante et al. 2010).

Los suelos sufren degradación física a través de la erosión y compactación. La degradación química ocurre debido a la acidificación, al agotamiento de nutrientes, a la contaminación 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).

La biodiversidad del suelo ha sido identificada como un área que requiere particular atención en la agenda de trabajo de institutos de investigación, organizaciones

internacionales, sectores públicos y privados y gobiernos, dada la importancia que tienen los organismos que habitan el suelo al contribuir con un amplio rango de servicios esenciales para el funcionamiento sustentable de todos los ecosistemas.

La biodiversidad confiere estabilidad y resiliencia a los ecosistemas. Debido a los beneficios económicos de la biodiversidad del suelo en términos de sustentabilidad, existe actualmente un mayor interés en comprender y conservar la diversidad de las comunidades edáficas. Este es uno de los grandes retos que enfrenta la agricultura para alcanzar la sustentabilidad, aspecto que fue totalmente ignorado durante la revolución verde. Tanto la función como la estructura de las comunidades microbianas están altamente afectadas por las características del suelo y la diversidad vegetal, pero también responden a alteraciones en las condiciones ambientales debidas a la intervención antropogénica a través de las prácticas agrícolas (Ball et al. 2009; Butenschoen et al. 2011). La agricultura sustentable procura mantener un nivel de productividad de los cultivos en el tiempo, sin comprometer los componentes estructurales y funcionales de los agroecosistemas. Históricamente, la evaluación de éstos se ha centrado en la cuantificación de su producción, mientras que la valoración de los procesos biológicos esenciales para su funcionamiento ha sido escasamente contemplada. Los sistemas de producción del Uruguay no escapan a esta realidad.

## ***2.1 Sistemas de producción agrícola en Uruguay***

Desde las etapas iniciales del desarrollo de la agricultura hasta fines de los años 50, nuestro país se caracterizó por la siembra continua de cultivos, con laboreo convencional, sin el control de erosión ni agregado de fertilizantes. Esto condujo a balances negativos de C, N y P en el suelo y el consiguiente deterioro de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. A partir de la década del 60, se inició la aplicación de fertilizantes (N, P, K) y en 1970 comenzaron a incluirse pasturas (gramíneas y leguminosas) sembradas en rotación con los cultivos. Las rotaciones cultivo-pastura contribuyen a la sustentabilidad porque tienen la capacidad de revertir los procesos de degradación de los suelos, recuperando en parte su potencial productivo (Díaz 2003). De las especies que integran las pasturas, las leguminosas forrajeras son el principal componente restaurador y sus ventajas sólo se capitalizan si se asegura su persistencia productiva (Altier 1996).

A principios de los 80s, se comenzaron a implementar prácticas de conservación de suelos y se desarrollaron las primeras experiencias en siembra directa de cultivos. Desde el inicio de los 90s, la siembra directa fue adoptada rápidamente por un importante número de productores (Morón 2003).

Las prácticas que pueden causar las menores perturbaciones ambientales para la biota del suelo son aquellas que consideran el manejo de los residuos, la reducción o ausencia completa del laboreo y la diversificación temporal (rotaciones) y espacial (pasturas mixtas) de cultivos. En nuestro país, en materia de manejo sustentable de suelos agrícolas, se dispone actualmente de dos grandes alternativas tecnológicas. Por un lado, las rotaciones de pasturas y cultivos que aumentan la diversificación

productiva (sistemas mixtos de producción) y, por otro, la reducción del laboreo, teniendo su máximo desarrollo en la siembra directa.

La evaluación de la sustentabilidad de los sistemas de producción que adoptan nuevas tecnologías plantea la necesidad de cuantificar y comprender las variables del suelo químicas, físicas y biológicas, así como también disponer de indicadores que permitan determinar la calidad/salud del suelo (Doran & Zeiss 2000). Así se podrá explicar y alertar sobre el impacto ambiental a largo plazo que tendrán las innovaciones de manejo de los suelos y cultivos (Díaz 2003).

## ***2.2 Beneficios de la rotación de cultivos***

La agricultura de granos es la responsable de los mayores problemas ambientales que acompañaron el desarrollo productivo en muchas regiones del mundo. La preparación anual de suelos condujo a la degradación y erosión de los suelos más productivos en vastísimas regiones, ya que pocas actividades humanas se desarrollan en tanta extensión territorial. Uruguay no ha sido ajeno a eso (Díaz 2003). La materia orgánica de nuestros suelos comenzó a ser afectada hace aproximadamente 500 años con la introducción del ganado, especialmente por los grandes períodos de sobrepastoreo que condujeron a la pérdida de misma. Desde hace aproximadamente 100 años el impacto fue mayor, con el comienzo de la agricultura continua con laboreo, que determinó grandes pérdidas de suelos y su materia orgánica. Hace 50 años comenzaron a adoptarse las rotaciones con pasturas que tienden a equilibrar el proceso promoviendo la acumulación de materia

orgánica. En los últimos 20 años con la eliminación del laboreo por adopción de la siembra directa surge otra potencial contribución en este sentido. La acción del hombre ocurre en un período muy breve en relación al proceso de formación de un recurso natural y puede ser muy grave, por lo que es importante comprender las consecuencias del manejo de los suelos (Díaz 2003).

Las rotaciones de cultivos se asocian al concepto de sustentabilidad ambiental y productiva, ya que es una práctica de producción que permite mitigar y superar varios problemas del monocultivo. Las rotaciones de cultivos pueden ser simplemente la alternancia de cultivos anuales, o implicar la introducción de pasturas en rotación con cultivos, con mayor potencial para contribuir a la sustentabilidad (Díaz 2003). La nutrición de los cultivos puede ser mantenida mediante la inclusión de leguminosas en la rotación y el reciclado de nutrientes a partir de los residuos del cultivo anterior y de las heces de los animales que las pastorean si se incluyen leguminosas forrajeras (Gosling et al. 2010).

La rotación de cultivos también ha demostrado ser beneficiosa para disminuir la incidencia y severidad de pestes y enfermedades, dado que el huésped de los diferentes fitopatógenos es alternado en el tiempo (Gosling et al. 2010). Existen numerosos ejemplos de esto, en diversos cultivos y con diferentes patógenos. Enfermedades de la papa causadas por *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces scabiei*, *Spongopora subterranean* y *Verticillium dahliae* han sido reducidas en un 10 a un 50% en relación al cultivo continuo mediante la introducción de rotaciones. Dichos efectos se espera que sean mayores luego de varios ciclos de rotación, particularmente en relación a las enfermedades producidas por organismos

patógenos del suelo (Larkin & Honeycutt 2006; Larkin, Honeycutt, Griffin, et al. 2011; Bernard et al. 2012).

La efectividad de las rotaciones para reducir enfermedades puede depender de la especie vegetal incluida en la rotación y del patógeno considerado. En un experimento de rotaciones en papa, se determinó que dos tipos de abonos verdes redujeron un 18 y 25 % más el marchitamiento causado por *Verticillium* sp. que la rotación con cebada, pero la rotación con mostaza fue mejor en reducir otras enfermedades del suelo, aumentando el rendimiento de la papa en un 12% comparado con la rotación con cebada. Sin embargo, ninguna rotación igualó el efecto del tratamiento químico, que redujo 35% el marchitamiento causado por *Verticillium* sp. y aumentó un 18% el rendimiento. Además, en el segundo ciclo de rotaciones sólo la fumigación química logró reducir las enfermedades, indicando que pueden ser necesarios varios años para alcanzar el potencial de las rotaciones para suprimir patógenos en suelos muy infectados (Larkin, Honeycutt & Olanya 2011). En un estudio más reciente, la rotación del cultivo de papa con canola (*Brassica napus*) como abono verde redujo de un 10 a un 52% las enfermedades del suelo causadas por *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium solani* y *Streptomyces scabiei* (Bernard et al. 2014).

En un estudio realizado en México sobre las prácticas aplicadas por pequeños productores durante 15 años, se determinó que la incidencia de la podredumbre de raíz en maíz causada por patógenos del suelo disminuyó cuando se plantó en rotación con trigo. Esta práctica asociada a otras como la siembra directa y la retención de residuos puede llevar a aumentos de un 25-30% en la producción en

comparación con prácticas comunes de producción como el laboreo, el monocultivo y la remoción de los residuos (Govaerts et al. 2008).

Los mecanismos parcialmente responsables de la reducción en las enfermedades incluyen cambios en las comunidades microbianas del suelo mediados por las plantas u otros microorganismos (Bernard et al. 2012). El aumento en los rendimientos de los cereales en rotación con leguminosas, puede deberse a los cambios producidos en la rizósfera que potencian el crecimiento temprano de la planta (Alvey et al. 2003). Por otra parte, aquellas comunidades que habitan el suelo no rizosférico, pueden ser las que reflejen mejor la influencia potencial que tendrán en los cultivos sucesivos de la rotación (Larkin 2003).

### ***2.3 Microorganismos del suelo***

Los microorganismos del suelo juegan roles vitales en varios ciclos geoquímicos y están implicados en el 90 % de los procesos en este ecosistema, muchos importantes para la calidad del suelo: regulan la descomposición de la materia orgánica, el reciclaje y la disponibilidad de nutrientes y contribuyen a la formación y el mantenimiento de la estructura edáfica (Kirk et al. 2004; Brussaard et al. 2007). También contribuyen a la nutrición y salud de las plantas, dado que sirven como depósito y fuente de la mayoría de los nutrientes, son capaces de solubilizar minerales, producir hormonas vegetales, fijar el nitrógeno atmosférico, causar enfermedades o antagonizar microorganismos deletéreos (Bardgett et al. 1997; Kirk et al. 2004). Aunque los flujos de importantes gases con efecto invernadero como el

metano, óxido nitroso y dióxido de carbono no son procesos enteramente resultantes de la actividad microbiana, se ha sugerido que los mecanismos de fondo involucran cambios en la diversidad y actividad de las poblaciones bacterianas (Griffiths et al. 2003). También participan en la provisión de servicios ecosistémicos tales como resistencia y resiliencia contra perturbaciones y estrés (Brussaard et al. 2007).

Las comunidades bacterianas del suelo y los procesos mediados por ellas son críticos para el funcionamiento del ecosistema edáfico y su productividad. Por esto, existe la necesidad de integrar la comunidad bacteriana del suelo a nuestro entendimiento de las interacciones ecosistémicas a diferentes escalas (planta, comunidad vegetal y paisaje) (Kuske et al. 2002). Está bien establecido que la presencia o ausencia de grupos funcionales importantes de bacterias del suelo, por ejemplo los fijadores de nitrógeno, pueden tener una fuerte influencia en los procesos de las plantas y el suelo. Sin embargo, la comprensión de cómo la composición de bacterias dentro de los grupos funcionales (por ej. las heterótrofas) puede alterar la dinámica del ecosistema permanece incompleta. Dada la gran variación en las tasas de crecimiento y tiempos de generación, y la capacidad para utilizar distintos sustratos orgánicos que presentan las poblaciones de los diferentes géneros, es altamente probable que la composición bacteriana influya en los flujos de carbono y nutrientes del suelo (Frank et al. 2003).

Algunos parámetros microbianos tales como su biomasa, respiración y actividades enzimáticas son aspectos importantes de la salud del suelo, y representan valiosas herramientas para monitorear la calidad de este recurso (Sharma et al. 2011).

## **2.4 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal**

Los microorganismos influyen en la fertilidad de los suelos agrícolas, especialmente con respecto a la disponibilidad de nutrientes para las plantas y a la supresión de patógenos (Kennedy & Smith 1995).

Entre las formas de promoción directa del crecimiento vegetal, el aporte de nitrógeno a las plantas por bacterias del suelo es la que ha sido mejor caracterizada. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) atmosférico a formas químicas asimilables por los organismos superiores sólo puede ser efectuado por procariotas de los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Los microorganismos reducen el N<sub>2</sub> mediante el complejo enzimático nitrogenasa, el cual es altamente conservado. Algunos microorganismos como los de la familia *Rhizobiaceae* realizan la FBN en asociación simbiótica con plantas leguminosas, mientras que otros pueden fijar nitrógeno en vida libre, como los pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*, entre otros (Colnaghi et al. 1997).

La supresividad de patógenos vegetales involucra una menor incidencia de enfermedades por ausencia del patógeno o incluso a pesar de la presencia del mismo. Este fenómeno ha sido conceptualmente dividido en supresividad general y específica. La primera está asociada a comunidades, y generalmente se desconocen los microorganismos y mecanismos responsables. La supresividad específica se debe a interacciones específicas entre fitopatógenos y uno o más antagonistas, por ejemplo, un productor de antibióticos. La expresión del potencial supresivo para fitopatógenos dependerá de los determinantes abióticos y de la estructura de la comunidad microbiana del suelo. Asimismo, la supresividad contra patógenos está

afectada por diferentes estrategias de manejo de suelos (van Elsas et al. 2002). En suelos supresivos, ciertos géneros bacterianos tales como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* y las actinobacterias se encuentran a menudo en altas poblaciones (van Bruggen & Semenov 2000).

Las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (actinobacterias) han sido extensamente estudiadas como agentes de control biológico. Los mecanismos de acción que determinan su antagonismo de patógenos incluyen: competencia por nutrientes, producción de antibióticos o de enzimas hidrolíticas, e inducción de resistencia en la planta (Ligon et al. 2000). Alternativamente, cepas pertenecientes a estos géneros incrementan el crecimiento de la planta porque solubilizan nutrientes, liberan fitohormonas o disminuyen el nivel de metales pesados en el suelo, por lo que se las incluye dentro del grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR<sup>1</sup>) (Kloepper 1995). La producción de antibióticos en el suelo también se debe en gran medida a la presencia de actinobacterias. Estos organismos también pueden parasitar patógenos fúngicos mediante la degradación de sus esporas (Whipps 2001).

Por estas razones, determinar los manejos del suelo que influyen de forma positiva o negativa en estas comunidades permitirá mejorar la salud y nutrición de las plantas mediante la implementación de prácticas agropecuarias adecuadas.

---

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

## **2.5 *Diversidad microbiana***

Las comunidades microbianas son extremadamente diversas. Su diversidad incluye la composición genética de los microorganismos, el ambiente o hábitat donde se encuentran y su rol ecológico o funcional dentro del ecosistema (Schinner 1996; Hunter-Cevera 1998).

Pueden haber grandes diferencias entre las evaluaciones de la diversidad microbiana presente en ambientes naturales realizadas con diferentes técnicas. Estas diferencias reflejan el estado fisiológico de las bacterias, las cuales pueden ser cultivadas bajo ciertas condiciones y desarrollarse en formas durmientes y probablemente no cultivables bajo otras condiciones. A partir del desarrollo de la ecología microbiana molecular se ha demostrado que la diversidad microbiana en la naturaleza es mucho mayor de lo que se pensaba. Tanto por métodos dependientes como independientes de cultivo se ha establecido que el suelo representa uno de los hábitats más diversos para los microorganismos. Nuestro conocimiento de la diversidad microbiana del suelo es limitado, y los estudios realizados mediante técnicas de ecología microbiana molecular sugieren que existen grupos bacterianos importantes en el suelo que desconocemos (Hunter-Cevera 1998; Rondon et al. 1999; Kuske et al. 2002; Kirk et al. 2004).

Las variaciones en la distribución temporal y espacial de las bacterias, debido a las variaciones en la distribución del recurso, son factores que posibilitan una mayor diversidad total de estos organismos. Dado su pequeño tamaño y la variabilidad espacial a pequeña escala en el suelo, se pueden desarrollar comunidades específicas de cada micrositio, aumentando su diversidad en un suelo dado. Esta

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

Las poblaciones microbianas son una parte integral de las funciones del ecosistema. Se ha propuesto que la pérdida de especies bacterianas podría no cambiar el funcionamiento del ecosistema, los procesos biológicos o las transformaciones bioquímicas, debido a la redundancia en su actividad. Sin embargo, esta afirmación

puede estar limitada al poco conocimiento que poseemos de las características de las bacterias cultivadas, que constituye un porcentaje pequeño de la población total. La redundancia en bacterias parece no ser importante, sino que puede existir un alto nivel de especialización en los sistemas bacterianos. Organismos funcionalmente similares pueden exhibir requerimientos de crecimiento y sobrevivencia variados, y tolerar diferentes ambientes o hábitats. Poco se sabe sobre el grado y función de la diversidad microbiana en suelos, dado que la ecología microbiana ha sido separada tradicionalmente de la ecología general (Hunter-Cevera 1998; Kennedy 1999).

Las funciones microbianas en los ecosistemas son tan diversas como los propios microorganismos, por lo que algunos microbiólogos creen que puede ser más útil examinar la diversidad funcional que la estructural (Hunter-Cevera 1998; Kennedy 1999). La combinación de diferentes métodos que contemplen tanto las funciones como la estructura de la comunidad microbiana parece lo más adecuado para evaluar la respuesta de los microorganismos frente a cambios ambientales o perturbaciones (Ovreås 2000).

## ***2.6 Métodos para el estudio de la diversidad microbiana***

Los microorganismos son extremadamente difíciles de investigar en la naturaleza, debido a su pequeño tamaño y su simplicidad morfológica. Esto ha llevado al uso del cultivo para analizarlos, resultando en que algunos microorganismos han sido muy bien estudiados, pero la gran mayoría no lo han sido. Las metodologías moleculares permiten caracterizar la diversidad microbiana con menor sesgo, para

proveer una imagen más precisa de las comunidades y de su función en los ambientes naturales (Rondon et al. 1999).

Los métodos para estudiar la composición de las comunidades microbianas en el suelo y estimar su diversidad pueden clasificarse en dos grupos: técnicas bioquímicas y moleculares. Dentro de las técnicas bioquímicas se incluyen los recuentos, el perfil fisiológico de la comunidad por utilización de sustratos y el análisis de FAME<sup>2</sup>. Tradicionalmente, la diversidad ha sido evaluada usando plaques selectivos y recuento directo de viables. Estos métodos son rápidos, baratos y pueden proveer información sobre el componente activo heterótrofo de la población. Sus limitaciones incluyen la dificultad para separar las bacterias de las partículas del suelo o de *biofilms*, la selección de los medios y las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, luz) apropiados, la incapacidad para cultivar un gran número de bacterias con las técnicas actuales, la posibilidad de inhibición del crecimiento entre colonias y el potencial esparcimiento de las mismas. Además, el recuento en placa favorece aquellos microorganismos con altas tasas de crecimiento. Todas estas limitaciones pueden influir en nuestra apreciación de la comunidad microbiana (Kirk et al. 2004).

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

---

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

cultivables, que son los que generalmente predominan (Kuske et al. 2002). Por esto el uso de PCR, que amplifica pequeñas cantidades de ADN y detecta microorganismos presentes en bajo número en el ambiente, es ventajoso para evaluar la diversidad microbiana (Hunter-Cevera 1998).

Muchos métodos para investigar la diversidad microbiana están basados en el análisis de secuencia del gen del ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S o 18S para procariotas o eucariotas, respectivamente) ya que permite su identificación, así como la predicción de sus relaciones filogenéticas. Generalmente, se aísla el ADN de muestras ambientales y se amplifica por PCR el ADN blanco utilizando cebadores universales o específicos. Posteriormente, los productos resultantes se separan de varias formas, obteniéndose una “huella digital” (*fingerprinting*) de la comunidad (Rondon et al. 1999; Kirk et al. 2004). Los métodos de *fingerprinting* de comunidades más frecuentemente usados son DGGE y TGGE<sup>3</sup>, que separan secuencias en base a diferencias en las propiedades de desnaturalización, y por lo tanto en base a sus distancias de migración en gradientes químicos y de temperatura, respectivamente. Teóricamente, la DGGE puede separar moléculas de ADN con un par de bases de diferencia. Bandas específicas de DGGE pueden ser escindidas del gel, re-amplificadas y secuenciadas, para aportar más información sobre microorganismos específicos y grupos taxonómicos de la comunidad. Estos métodos permiten comparaciones rápidas, reproducibles y en cierto modo baratas, ya que varias muestras pueden ser analizadas simultáneamente. Son usados generalmente para detectar cambios en las poblaciones microbianas a lo largo del tiempo y/o bajo diferentes condiciones

---

<sup>3</sup> DGGE y TGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante o de temperatura (del inglés: *Denaturing/ Temperature Gradient Gel Electrophoresis*).

ambientales. Estas técnicas permiten realizar análisis de agrupamiento de los patrones de bandeo, y comparar la presencia e intensidad relativa de bandas individuales para calcular índices de diversidad, aunque recientemente se ha cuestionado la validez de los análisis comparativos de diversidad mediante estos métodos (McCaig et al. 2001; Kirk et al. 2004; Neilson et al. 2013).

Más recientemente se ha comenzado a aplicar la secuenciación masiva para caracterizar las comunidades microbianas presentes en muestras ambientales, permitiendo una mayor cobertura de los microorganismos presentes en las mismas (Rastogi & Sani 2011). Esta técnica requiere una mayor inversión económica (principalmente cuando se trabaja con un gran número de muestras) y de una buena capacidad de análisis de datos bioinformáticos, pero su potencialidad para describir comunidades complejas supera ampliamente a las técnicas de *fingerprinting*. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que para responder algunas preguntas, ambos abordajes son equivalentes (Cleary et al. 2012).

Típicamente, los estudios de diversidad incluyen la diversidad relativa de comunidades a lo largo de un gradiente de estrés, una perturbación u otra diferencia biótica o abiótica (Kirk et al. 2004). Utilizando diversas técnicas moleculares, (Ovreäs & Torsvik 1998) encontraron que la diferencia entre dos suelos agrícolas fue significativamente mayor cuando se analizó la población bacteriana total que mediante el estudio de la población cultivable. Los métodos como la DGGE son potencialmente capaces de detectar cambios en la estructura de la comunidad a nivel de especie, y por lo tanto se espera que detecten cambios menores en la comunidad (Kirk et al. 2004).

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

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

## ***2.7 Efectos de las prácticas agrícolas sobre las comunidades microbianas del suelo***

A partir del análisis histórico del proceso de adopción de tecnologías, se plantean interrogantes en cuanto al efecto de las mismas sobre las propiedades del suelo que determinan la sustentabilidad de los agroecosistemas. Las perturbaciones humanas asociadas con la agricultura han emergido como una de las principales fuerzas que

dan forma a la diversidad, estructura y productividad de los ecosistemas en todo el planeta (Vitousek et al. 1997). Hasta ahora, mucho esfuerzo de investigación ha estado dirigido a entender cómo las prácticas agrícolas y de manejo del suelo influyen en la estructura y diversidad de las comunidades aéreas. Sin embargo, a medida que aumenta la conciencia sobre la importancia de los organismos del suelo en regular los procesos ecosistémicos, tales como ciclado de nutrientes y descomposición de la materia orgánica, aumentan los estudios de cómo los organismos descomponedores responden a regímenes de perturbaciones, y especialmente a aquellos relacionados a la agricultura (Bardgett et al. 2001). Cuando un sistema natural es modificado por las actividades humanas con el objetivo de producir alimentos, los cambios principales ocurren en el suelo y en las comunidades biológicas presentes en el mismo.

El número y actividad de los microorganismos del suelo dependen altamente de características de las comunidades de las plantas como su diversidad, composición de especies, genotipo, estado de desarrollo, cobertura del suelo, penetración de las raíces, restos vegetales, etc. Las comunidades bacterianas, en particular, tienen una dependencia importante del cultivo presente, puesto que la planta ejerce una selección específica mediante los exudados de la raíz y los restos vegetales, siendo a veces los mayores determinantes de su estructura y funcionamiento (Latour et al. 1996; Schinner 1996; Miethling et al. 2000; Wieland et al. 2001; Garbeva et al. 2008; Ball et al. 2009; Berg & Smalla 2009; Andreote et al. 2010; Maul & Drinkwater 2010; Butenschoen et al. 2011; Lamb et al. 2011).

Los estudios dedicados a evaluar el rol de la diversidad de macrófitas sobre la estabilidad, resiliencia y funcionamiento de los ecosistemas asumen un

acoplamiento entre la diversidad vegetal sobre el suelo y la diversidad microbiana bajo el mismo. En realidad, se ha asumido por mucho tiempo que las comunidades vegetales gobiernan la diversidad microbiana del suelo, pero poco se sabe sobre cómo la composición de especies vegetales y su diversidad influye en la composición de la comunidad de microorganismos del suelo. En algunos estudios sólo se observaron efectos de la diversidad vegetal sobre los perfiles de la comunidad bacteriana de la rizósfera, y no del resto del suelo. Estos resultados demuestran que el nivel de acoplamiento entre las comunidades de macrófitas y las microbianas está relacionada al grado de las interacciones involucradas (Kowalchuk et al. 2002). Sin embargo, otros estudios mostraron que la influencia de las plantas sobre la comunidad microbiana del suelo se extiende más allá de la rizósfera, alterando el funcionamiento de la misma también en el resto del suelo (Kirk et al. 2004).

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

Existen diversos antecedentes sobre el efecto del manejo del suelo sobre las comunidades microbianas. Buckley & Schmidt (2003) reconocieron diferentes patrones en la estructura de comunidades microbianas en suelos con o sin historia reciente de cultivo. Se han encontrado claras diferencias en la estructura y en la diversidad fisiológica de varios grupos microbianos entre suelos bajo pasturas permanentes, monocultivos o sometidos a rotaciones (van Elsas et al. 2002). En otro

estudio, se observó que las técnicas de manejo agrícola (laboreo, laboreo mínimo o laboreo cero) impactaron la composición de la comunidad microbiana más que la cantidad de precipitaciones (Kirk et al. 2004). Sin embargo, no se detectaron diferencias entre la estructura de la comunidad bacteriana de rizósfera de maíz en tratamientos bajo siembra directa o con laboreo (Schmalenberger & Tebbe 2003).

El impacto de las prácticas agrícolas sobre las comunidades microbianas del suelo ha sido observado por ejemplo luego de la aplicación de compost (Bernard et al. 2012) y por la rotación de cultivos (Viebahn et al. 2005; Larkin 2008; Bernard et al. 2012). Sin embargo, los resultados pueden depender de las técnicas utilizadas y del grupo microbiano analizado. Viebahn et al. (2003; 2005) observaron un impacto de la rotación del cultivo de papa sobre las comunidades de Ascomycetes por DGGE pero no sobre la comunidad microbiana total por ARDRA.

Dado que la rotación de cultivos y otras prácticas como el manejo de residuos vegetales y la solarización son comúnmente asociadas a la reducción de enfermedades, su efecto ha sido más estudiado sobre la interacción de microorganismos benéficos y patógenos del suelo (Raaijmakers et al. 2009). Sin embargo, otros integrantes de las comunidades que tienen importancia para el rendimiento y la salud de los cultivos también podrían verse afectados por estas prácticas. Pocos estudios han analizado el efecto de prácticas agrícolas sobre grupos funcionales o filogenéticos específicos como las micorrizas, bacterias del ciclo de nitrógeno o solubilizadoras de fosfato (Zarea et al. 2009; Wakelin et al. 2010; Azziz et al. 2012). En los últimos años varios estudios han utilizado métodos dependientes e independientes de cultivo para estudiar el impacto de técnicas de manejo agrícola sobre la estructura y función de las comunidades microbianas del suelo bruto, pero

menos se han enfocado al análisis de las comunidades rizosféricas (Bajsa et al. 2013).

La diversificación temporal o espacial de cultivos a través de la rotación o el cultivo mixto se espera que influya en las comunidades microbianas dada la importancia que tiene la especie vegetal en su estructura y función (Garbeva et al. 2008). El efecto de la rotación de cultivos y el monocultivo ha sido documentado para poblaciones totales de bacterias y hongos, diversidad de bacterias totales o específicas de un grupo, bacterias antagonistas, micorrizas arbusculares y actividades enzimáticas (Garbeva et al. 2008; Gorch-Lira & Stefaniak 2009; Tian et al. 2009; Sharma et al. 2012).

Algunos estudios mostraron que la diversificación de las rotaciones puede resultar en mayor biomasa microbiana que el cultivo continuo de granos (Zelles et al. 1992; Zelles et al. 1995; Drijber et al. 2000). En general, varios estudios indicaron que los sistemas de pradera y el agregado de materia orgánica tienden a aumentar la biomasa y diversidad microbianas, mientras que los suelos con barbecho presentan menor biomasa y diversidad (Zelles et al. 1992; Zelles et al. 1995; Bossio et al. 1998). Dichos cambios pueden depender del tipo de cultivo incluido en la rotación, y no siempre implicar una mejora en el estado de la materia orgánica o la actividad microbiana, vitales para el ciclado de nutrientes y la productividad a largo plazo del suelo.

En nuestro país existen varios estudios sobre las propiedades físicas y químicas del suelo en diferentes agroecosistemas, y su relación con la calidad del mismo (García & Morón 1992; Morón & Sawchick 2002). Sin embargo, la información sobre la

composición de las comunidades edáficas, sus interrelaciones y su relación con la calidad del suelo es escasa. En un estudio en praderas naturales se determinó que el efecto producido por el pastoreo bovino sobre los hongos del suelo no es revertido luego de 5 años de exclusión del mismo, que llevó a un cambio en el número de propágulos más que en la composición de las comunidades (Bettucci et al. 1993). Se han realizado algunas evaluaciones sobre los cambios estructurales y funcionales de ecosistemas microbianos edáficos provocados por los cambios en el uso del suelo. La comparación entre calidad de suelo bajo plantaciones de *Eucalyptus* spp. con más de 20 años y bajo praderas naturales mostró que la biomasa microbiana se mantiene aunque la estructura ecosistémica sea diferente, incrementándose la representación de hongos y los mecanismos oxidativos (Carrasco 2003). Estudios similares realizados por Sicardi et al. (2004) mostraron diferencias en la respiración del suelo, el coeficiente de mineralización de carbono y actividades enzimáticas, resultando estas últimas buenos indicadores de calidad de suelo. Pereyra et al. (2003) evaluaron el efecto de la siembra directa o en cobertura y el uso de herbicidas sobre indicadores biológicos de la calidad de suelo, en un ensayo con dos años de antigüedad y observaron que el potencial de inóculo de hongos endomicorrízicos fue estimulado por ambos sistemas de labranza. Por otra parte, existen estudios sobre la composición de la comunidad microbiana y su actividad metabólica en cultivos de arroz, que se enfocan en las bacterias del ciclo del nitrógeno y oxidantes de metano, combinando métodos moleculares y dependientes de cultivo (Fernández Scavino et al. 2010).

## ***2.8 Experimentos de larga duración de rotaciones cultivos***

Mediante el estudio sostenido de secuencias de rotaciones se pueden generar bases de datos que permitan correlacionar las propiedades del suelo con el rendimiento de los cultivos, aportando valores deductivos confiables (Schoenholtz et al. 2000).

En Uruguay, existen algunos experimentos de larga duración para evaluar la introducción de pasturas cultivadas en rotación con cultivos. Desde 1963, en INIA-La Estanzuela se realiza un experimento en el que se evalúan diferentes sistemas de producción con laboreo convencional, comparándose la agricultura continua de cultivos de grano con rotaciones de éstos y pasturas (Morón & Díaz 2003). La introducción en Uruguay de la siembra directa llevó a la conducción desde 1995 de un experimento con similares características al anterior pero bajo siembra directa en INIA-Treinta y Tres (Terra & García Préchac 2001).

A lo largo de los años se ha incrementado la cantidad de variables estructurales, productivas y biológicas que fueron progresivamente estudiadas y monitoreadas en estos ensayos. En los comienzos los estudios se limitaron prácticamente al seguimiento de nutrientes, materia orgánica y la producción de las pasturas y cultivos. Progresivamente se fueron incorporando evaluaciones de propiedades físicas, fracciones del fósforo, biomasa microbiana, potenciales de mineralización, malezas, epidemiología de enfermedades, insectos, aspectos económicos, mesofauna del suelo, etc. Se ha progresado mucho en la comprensión de los aspectos básicos que gobiernan los tratamientos aplicados en los diferentes sistemas de manejo del suelo y cómo los mismos explican la producción de cultivos y pasturas (Terra & García Préchac 2001; Morón & Díaz 2003). La existencia de estas áreas

experimentales permite realizar estudios para determinar el impacto de la intensidad de uso del suelo sobre otros componentes bióticos como las comunidades bacterianas que no han sido aún abordadas.

## **2.9 ANTECEDENTES**

En el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE, en colaboración con investigadores de INIA, se comenzó a trabajar en una línea de investigación para identificar los efectos de diferentes prácticas agrícolas sobre las comunidades microbianas del suelo, con énfasis en aquellas capaces de favorecer el crecimiento de las plantas.

El estudio del impacto de sistemas de producción agropecuaria sobre las comunidades microbianas presentes en suelos uruguayos se inició tomando como modelo ensayos de larga duración instalados en estaciones experimentales de INIA, en los que se evalúan diferentes sistemas de rotaciones agrícola-ganaderas bajo laboreo convencional o siembra directa, y el efecto del pastoreo bovino en campo natural. En estos ensayos se determinan regularmente parámetros vinculados a la producción y a las propiedades fisicoquímicas del suelo. Sin embargo, características relacionadas con las propiedades biológicas del suelo habían sido menos exploradas. En el marco de proyectos de investigación conjuntos se analizaron las comunidades microbianas, evaluando la abundancia y diversidad de las comunidades fúngicas patógenas y de las comunidades bacterianas con potencial como promotoras del crecimiento vegetal (*Pseudomonas* fluorescentes,

*Bacillus* spp., actinobacterias, bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) y solubilizadoras de fosfato).

Esta tesis se enmarcó en dos Proyectos de Investigación:

- “Evaluación de la biodiversidad en suelos bajo diferentes sistemas de producción”.

Proyecto PDT 108/29, DICYT. Responsable científico: Alicia Arias

- “Diversidad de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfato en suelos con rotaciones de cultivos”. Proyecto PDT 63/063, DICYT. Responsable científico:

Natalia Bajsa

Los ensayos de larga duración utilizados como modelo son llevados a cabo por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria y se sintetiza información sobre los mismos en las siguientes publicaciones:

- Morón, A. & Díaz, R. (2003). Simposio: 40 años de rotaciones agrícolas ganaderas.

INIA, Serie Técnica N° 134.

- Terra, J. & García-Préchac, F. (2001). Siembra directa y rotaciones forrajeras en las lomadas del este. Síntesis 1995-2000. INIA, Serie Técnica N° 125.

### **3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 HIPÓTESIS**

La rotación de cultivos de granos con pasturas modifica la estructura de las comunidades de bacterias del suelo promotoras del crecimiento vegetal, alterando su abundancia y diversidad.

#### **3.2 OBJETIVOS**

##### **3.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la rotación de cultivos de granos con pasturas sobre las comunidades de bacterias con potencial como promotoras del crecimiento vegetal.

##### **3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar en sistemas de rotaciones de cultivos de grano con pasturas:

1. La abundancia de las poblaciones cultivables de *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* spp., actinobacterias y bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre.
2. La estructura de la comunidad bacteriana total y de comunidades de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
3. Las relaciones entre las variables microbiológicas y las propiedades físicas y químicas del suelo.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Descripción de los ensayos

Se analizaron dos ensayos de larga duración ubicados en Estaciones Experimentales del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). En estos ensayos se evalúan sistemas de rotaciones agrícolas-ganaderas, aplicando tratamientos con diferente intensidad de uso del suelo (Figuras 1 y 2).

#### 4.1.1 Estación Experimental INIA - La Estanzuela, Colonia (34°20'S, 57°43'W).

Este ensayo se instaló en 1963 sobre un suelo de tipo Brunosol Éutrico (franco, arcillo, limoso) (Morón & Díaz 2003). En él se evalúan, bajo laboreo convencional, diferentes sistemas de uso de suelo que contrastan principalmente en la relación de períodos con pasturas y con cultivos de grano. Las parcelas son de 25 m por 200 m, instaladas a lo largo de la pendiente. Cada tratamiento cuenta con tres repeticiones no sícrónicas en bloques al azar. Los tratamientos seleccionados para este estudio, ordenados en intensidad decreciente de uso del suelo fueron:

**Cultivo continuo sin fertilización (CCS):** cultivos de grano con secuencia de sorgo (*Sorghum bicolor*) - cebada (*Hordeum vulgare*) - girasol 2<sup>a</sup> (*Helianthus annuus*) - trigo (*Triticum aestivum*) (Sistema 1).

**Cultivo continuo con fertilización (CCC):** cultivos de grano con la misma secuencia que CCS pero con aplicación de fertilizantes con N y P (Sistema 2).

**Rotación corta (RC):** 66% del tiempo de la rotación (4 años) con cultivos de grano (cebada - girasol 2<sup>a</sup> - trigo) y 33% (2 años) con trébol rojo (*Trifolium pratense*) (Sistema 7).

**Rotación media (RM):** 50% del tiempo (3 años) de la rotación con cultivos de grano (sorgo - cebada - girasol 2<sup>a</sup> - trigo) y 50% (3 años) con pradera artificial de trébol blanco (*Trifolium repens*), lotus (*Lotus corniculatus*) y festuca (*Festuca arundinacea*) (Sistema 5).

**Rotación larga (RL):** 33% del tiempo (1 año) de la rotación con cultivos de grano y 66% (2 años) con trébol rojo y pradera artificial de trébol blanco, lotus y festuca (Sistema 4).

#### **4.1.2 Estación Experimental Palo a Pique, INIA - Treinta y Tres (33°15'36"S, 54°29'26"W)**

Este ensayo se instaló en 1995 en suelos de tipo Argisol y Planosol para evaluar distintas intensidades de uso del suelo en siembra directa y bajo pastoreo bovino (Terra & García Préchac 2001; Terra & García Préchac 2002; Terra et al. 2006). Cada unidad experimental tiene un tamaño de 6 ha y los tratamientos aplicados, ordenados en intensidad decreciente de uso del suelo son:

**Cultivo continuo (CC):** dos cultivos forrajeros por año, en invierno avena (*Avena sativa*) en mezcla con raigrás anual (*Lolium multiflorum*) para pastoreo, y en verano sorgo (*Sorghum bicolor*) o moha (*Setaria italica*) para pastoreo o ensilaje.

**Rotación corta (RC):** 2 años de cultivos forrajeros como en CC y 2 años de pradera artificial compuesta por trébol rojo (*Trifolium pratense*) y raigrás (*Lolium multiflorum*).

**Rotación larga (RL):** 2 años de cultivos forrajeros como en CC y 4 años de pradera artificial compuesta por trébol blanco (*Trifolium repens*), lotus (*Lotus corniculatus*) y dactylis (*Dactylis glomerata*).

**Mejoramiento permanente (MP):** pradera artificial permanente de trébol blanco, lotus y raigrás renovada cada 3 o 4 años.

**Campo natural (CN):** pradera natural restaurada sin fertilización, con historia previa de agricultura.

Todos los tratamientos están sometidos a pastoreo bovino, con las siguientes cargas animales: CC a 2,5 UG<sup>4</sup>/ha, RC y RL a 1,9 UG/ha, MP a 1,4 UG/ha, y CN a 0,8 a 0,9 UG/ha.

El experimento no tiene repeticiones sincrónicas; todos los componentes de las diferentes rotaciones están presentes al mismo tiempo en 12 parcelas: 6 de RL, 4 de RC, 1 de CC, MP y CN. El tamaño de cada unidad experimental es de 6 ha. Con excepción del número de aplicaciones de glifosato por año, que está directamente relacionado con la intensidad del uso del suelo, los manejos de suelo y sanitario que reciben los tratamientos son similares. Las pasturas son fertilizadas con 30 kg/ha de N y 60 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a la siembra y refertilizadas en otoño con 50 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Los cultivos anuales de invierno o verano son fertilizados en la siembra con 30

---

<sup>4</sup> UG: unidades ganaderas

kg/ha de N y 30 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Durante la estación de crecimiento, después del pastoreo o corte, se aplican 35 kg/ha de N por año (Terra et al. 2006).

**Figura 1.** Mapa de Uruguay; se indican en color los Departamentos donde están localizados los ensayos que fueron analizados en esta tesis: Colonia (al oeste) y Treinta y Tres (al este).



#### **4.2 Obtención de muestras de suelo**

La toma de las muestras de suelo se realizó durante 4 años sucesivos (tabla 1), en otoño y primavera. Para los análisis microbiológicos, de cada tratamiento se tomaron 6 muestras compuestas de 15 tomas de suelo al azar con calador (diámetro 2-3 cm) a partir de la superficie del suelo (0-10 cm). Las muestras fueron secadas al aire a 20 °C en caso de ser necesario y tamizadas por malla de 2 mm para su homogeneización. Se conservaron dos fracciones de cada muestra, una a 4 °C y a otra a -20 °C o -80 °C para su posterior análisis.

Los análisis fisicoquímicos del suelo se realizaron a partir de una muestra compuesta por parcela, obtenida de 0-10 cm de profundidad.



**Figura 2.** Fotografías de algunos tratamientos de los ensayos analizados, en fase de cultivos de trigo o sorgo (izquierda) o pastura (derecha), en INIA-La Estanzuela (arriba) o INIA-Treinta y Tres (abajo).

**Tabla 1.** Fechas de muestreo, en primavera y otoño, en ambas estaciones experimentales.

	<b>INIA - La Estanzuela</b>	<b>INIA - Treinta y Tres</b>
<b>Primavera 1</b>	19/10/04	12/10/04
<b>Otoño 1</b>	13/04/05	20/04/05
<b>Primavera 2</b>	05/10/05	10/10/05
<b>Otoño 2</b>	10/05/06	22/05/06
<b>Primavera 3*</b>	---	---
<b>Otoño 3</b>	18/05/07	03/05/07
<b>Primavera 4</b>	24/10/07	18/10/07
<b>Otoño 4</b>	04/06/08	02/06/08

\* En la primavera de 2006 no se realizaron muestreos debido a la falta de continuidad en la financiación del proyecto.

### **4.3 Recuentos bacterianos**

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 por la técnica de recuento en placa. Para esto se suspendieron 5 g de suelo en 45 mL de pirofosfato de sodio 0.1% (p/v) estéril y se agitaron a 150 rpm durante 30 minutos. Se realizaron diluciones seriadas en pirofosfato de sodio 0.1% (p/v) estéril que se sembraron en gota para heterótrofos (por triplicado), incorporado para fijadores de nitrógeno (por duplicado) y en superficie para los restantes grupos bacterianos (por duplicado) en placas con 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).

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

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

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

**Bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre:** medio Nfb (Döbereiner 1980) suplementado con cicloheximida 100 µg/mL, con una sobrecapa de agar-agua 2 % (p/v) con cicloheximida 100 µg/mL.

Las placas se incubaron a 25°C y se determinó a las 48 h el número a de colonias totales (heterótrofos y *Bacillus*) o fluorescentes bajo luz UV (*Pseudomonas*). A los 7 días se contaron nuevamente heterótrofos, fijadores de nitrógeno y las colonias típicas de actinobacterias.

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

#### **4.4 Análisis molecular**

La estructura de la comunidad microbiana se evaluó por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) de productos de PCR obtenidos a partir del ADN extraído de muestras de suelo (Muyzer et al. 1993). Se amplificaron fragmentos del gen del ARN ribosomal 16S para analizar la comunidad bacteriana total o de ciertos grupos filogenéticos, y un fragmento del gen *nifH* para estudiar la comunidad diazotrófica.

En el primer caso (ARNr 16S) se analizaron 2 ó 3 muestras de los tratamientos más contrastantes de ambos ensayos, obtenidas en dos estaciones (primavera 1 y otoño 2) y conservadas a -80°C. La comunidad diazotrófica se analizó en 3 a 6

repeticiones de cada tratamiento de ambos ensayos, en las muestras de primavera 3, conservadas a -20°C.

**3.4.1 Extracción de ADN.** El ADN presente en cada muestra se obtuvo a partir de 0.5 g de suelo utilizando el kit FastDNA SPIN for Soil (Q-Biogene) y el equipo FastPrep® o el kit PowerSoil™ DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se analizó el tamaño del ADN por electroforesis en geles de agarosa 0.8% (p/v) con buffer TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM; pH 8) 0.5X o TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 9) 1X, a 80 V por 1 h (Sambrook et al. 1989). Además se estimó su concentración y pureza por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260, 280 y 320 nm (longitudes de onda con máximos de absorbancia para ácidos nucleicos, proteínas y ácidos húmicos, respectivamente).

**3.4.2 PCR (Polymerase Chain Reaction).** Se realizaron amplificaciones del gen del ARNr 16S a partir del ADN purificado, utilizando cebadores específicos para el dominio *Bacteria*, los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, y el filo *Actinobacteria*. También se analizó el gen *nifH* que codifica para una subunidad de la enzima nitrogenasa, responsable de la fijación biológica de nitrógeno (tabla 2). En el caso de los PCRs específicos de grupo se utilizó un PCR anidado, empleando una dilución del primer producto como molde para la segunda reacción. Los productos de PCR se analizaron primero en geles de agarosa 1% (p/v) en TBE 0.5X (100 V, 45 min) o TAE (90 V, 1 h) y luego por DGGE.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

<b>GRUPO</b>	<b>1a reacción</b>	<b>2a reacción</b>	<b>Referencia</b>
<i>Bacteria</i>	F968f-GC y R1401	----	Nübel et al. 1996
<i>Pseudomonas</i> spp.	Ps-f y Ps-r	F968f-GC y Ps-r	Widmer et al. 1998; Evans et al. 2004
<i>Bacillus</i> spp.	BacF y R1401	F968f-GC y R1401	Garbeva et al. 2003
<i>Actinobacteria</i>	F243 y R1401	F968f-GC y R1401	Heuer et al. 1997
Fijadores de N	FGPH19 y PolR	AQER y PolF-GC	Poly et al. 2001; Simonet et al. 1991

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

Las reacciones de PCR fueron realizadas de la siguiente forma:

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

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

consistió en un paso de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 62°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min (adaptado de Evans et al. 2004).

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

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

**Fijadores de nitrógeno.** Ambas mezclas de reacción contenían 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 0.5 µM de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 3.5 mM, 10 o 20 ng de seroalbúmina bovina (BSA), dimetilsulfóxido (DMSO) 5% (v/v), 1.25 o 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa y *Taq* buffer 1X en un volumen total de 25 o 50 µL en la primera o segunda reacción, respectivamente. En la primera reacción se utilizó 1 µL del ADN purificado (diluido 1/10 para las muestras de La Estanzuela y 1/20 para las muestras de Treinta y Tres) y en la segunda reacción se utilizaron 3 µL del producto

obtenido en la primera. Se seleccionó un programa de PCR con dos temperaturas de hibridación que consistió en 2 min a 94°C, 11 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 61°C y 2min a 72°C, 10 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C y 2 min a 72°C y una extensión final a 72°C por 5 min (Demba Diallo et al. 2004).

**3.4.3 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).** Los productos de PCR se analizaron por DGGE en un equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) o Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Systems TTGEK-2401 (C.B.S Scientific). Los geles de poliacrilamida contenían un gradiente lineal de agentes desnaturalizantes, diferente según el grupo bacteriano a analizar, y en algunos casos también un gradiente en el porcentaje de acrilamida (tabla 3). Se sembraron diferentes volúmenes de los productos de PCR con el objetivo de analizar cantidades de ADN comparables en todas las muestras. La corrida electroforética se realizó a 60°C utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 9; Sambrook et al. 1989) y en las condiciones especificadas en la tabla 3. Se utilizó alguno de los siguientes marcadores de migración: 1) mezcla de amplicones del gen del ARNr 16S obtenidos con los cebadores de *Bacteria* a partir de ADN de las cepas *Pseudomonas* sp. SVGG17, *Gluconoacetobacter* sp., *Serratia* sp. C16, *Bacillus liqueniformis* y *Rhodococcus* sp. Q (Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular, UFRJ – Brasil); 2) mezcla de productos de PCR del gen *nifH* de las siguientes cepas: *Herbaspirillum seropedicae* Z69, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Rhizobium loti* U226 y *Rhizobium fredii* (Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, IIBCE); 3) marcador de peso molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Los geles se revelaron con SYBRgreen y fotografiaron bajo luz UV. Las imágenes obtenidas se analizaron como se describe en el punto 4.

**Tabla 3.** Condiciones para la separación de los productos de PCR por DGGE.

<b>GRUPO</b>	<b>% de agentes desnaturalizantes en el gradiente*</b>	<b>Acrilamida (%)</b>	<b>Condiciones de electroforesis</b>	<b>Referencias</b>
<i>Bacteria</i>	40 - 70	6 - 9	70 V, 16 h	Peixoto et al. 2002
<i>Pseudomonas</i> spp.	50 - 70	6	70 V, 16 h	Evans et al. 2004
<i>Bacillus</i> spp.	45 - 65	6 - 9	100 V, 15 h	Garbeva et al. 2003
<i>Actinobacteria</i>	40 - 60	6	150 V, 6 h	Heuer et al. 1997
Fijadores de N <sub>2</sub>	45 - 70	6	70 V, 16 h	Demba Diallo et al. 2004

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

#### **4.5 Análisis físicoquímicos de suelo**

Los análisis físicoquímicos de las muestras de suelo fueron realizados por el Laboratorio de Análisis de Suelos y Agua de INIA-La Estanzuela. Se realizaron las siguientes determinaciones, mediante las técnicas indicadas entre paréntesis: pH (en agua); carbono orgánico (Tinsley); nitrógeno total (Kjeldahl); nitratos (CuSO<sub>4</sub> y potenciometría); amonio (KCl y colorimetría), potencial de mineralización de nitrógeno (PMN; incubación anaeróbica), fósforo disponible (Bray I para las muestras de La Estanzuela y ácido cítrico para las muestras de Treinta y Tres); contenido de bases: Ca y Mg, (acetato de amonio a pH 7; absorción atómica), K y Na (acetato de amonio a pH 7; emisión atómica), acidez titulable (acetato de calcio), capacidad de intercambio catiónico (CIC<sub>pH7</sub>; bases + acidez titulable), porcentaje de saturación de bases (% de la CIC ocupada por los cationes Ca, Mg, K

y Na), C-MOP (C en la materia orgánica particulada fina (f) o gruesa (g)), C-MOAM (C en la materia orgánica asociada a la fracción mineral) y textura (Bouyoucos).

#### **4.6 Análisis de datos**

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

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

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

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

PF: Peso Fresco; PS: Peso Seco

Estos valores fueron transformados a log<sub>10</sub> y analizados utilizando el programa Statistica 5.0. Se examinó la normalidad de los datos por el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett. En los casos donde la distribución de los datos fue normal y las varianzas homogéneas, se evaluaron para cada variable (abundancia de los grupos de bacterias) 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. Los análisis se realizaron de forma independiente para cada estación del año considerada.

**3.6.2 DGGE.** Los patrones de bandas de los geles de DGGE fueron analizados mediante una de las siguientes metodologías: 1) con el programa ImageQuant 5.2, descartándose las bandas que representaran menos del 1% de la sumatoria de la intensidad de las bandas de cada carril; a partir de los perfiles densitométricos se construyeron matrices binarias de presencia y ausencia de bandas y se realizaron análisis de agrupamiento de las muestras con el programa Statistica 7.0; 2) con el programa GelCompar II. En ambos casos se utilizó el coeficiente de Pearson para determinar la distancia métrica y el algoritmo UPGA (Unweighted Pair-Group Average) para construir los dendogramas (Peixoto et al. 2006; Aboim et al. 2008).

**3.6.3 Cálculo de índices de diversidad.** Los índices de diversidad fueron calculados a partir de los resultados de DGGE utilizando el programa Past. El índice de Shannon (H) (Shannon & Weaver 1963) fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:  $H = - \sum P_i \log P_i$ , donde  $P_i$  es la proporción representada por cada banda de DGGE (en superficie) en relación al número total de bandas. El índice de Simpson se calculó como  $\lambda = 1 - \sum P_i^2$ . El índice de Equitatividad fue calculado como  $E = H / \ln R$  (Eichner et al. 1999), donde la medida riqueza (R) es calculada como el número de genotipos (bandas) encontrados en una muestra (Peixoto et al. 2010; Liu et al. 2007; Wu et al. 2011).

**3.6.4 Análisis multivariados.** Para evaluar las interacciones entre las variables biológicas, físicas y químicas del suelo se seleccionó el análisis de componentes principales (ACP) que es un método de ordenación lineal, a partir de los valores del gradiente de recambio de las variables en un análisis DCA (Detrended Correspondence Analysis) según ter Braak & Smilauer (1998). Los datos de las variables se estandarizaron mediante la fórmula:  $(\text{valor}-\text{media})/\text{desvío estándar}$ . Se utilizó el programa Canoco 4.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *Abundancia de poblaciones bacterianas cultivables en suelo*

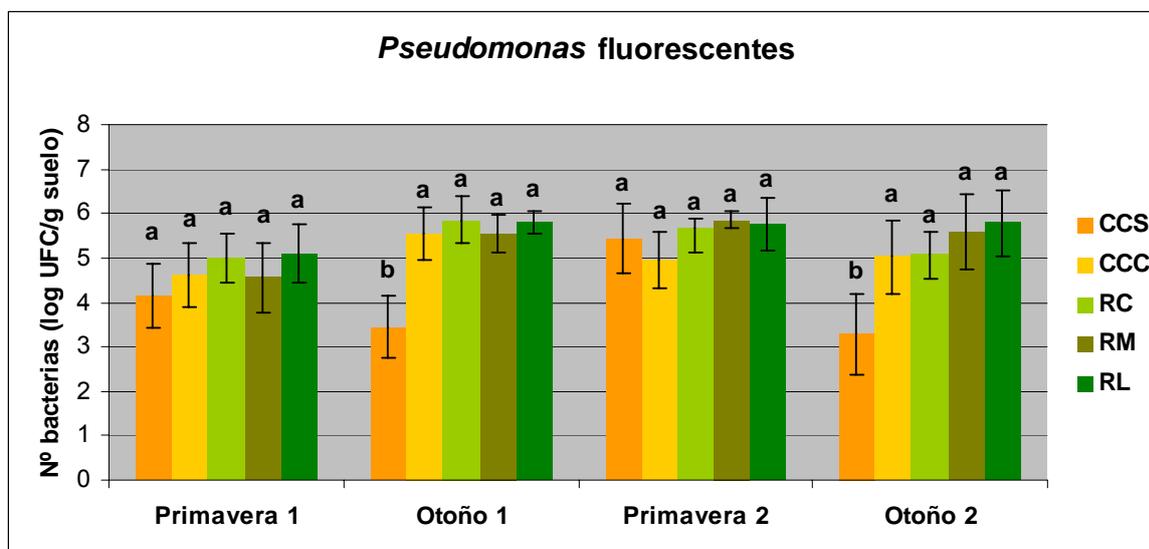
Se determinó el tamaño de poblaciones cultivables de bacterias con potencial como promotoras del crecimiento vegetal, en el suelo de ambos ensayos de rotaciones, durante varias estaciones de muestreo. También se determinó la población de las bacterias heterótrofas aerobias como una referencia del estado general de la microbiota del suelo.

El número de bacterias determinado para cada grupo se encontró aproximadamente en los mismos órdenes de magnitud en todos los muestreos. En ambos ensayos, en general la tendencia observada fue una mayor abundancia de bacterias en las parcelas con mayor proporción de pasturas en el tratamiento agrícola, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas en todos los casos. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre tratamientos en cada estación y sitio de muestreo.

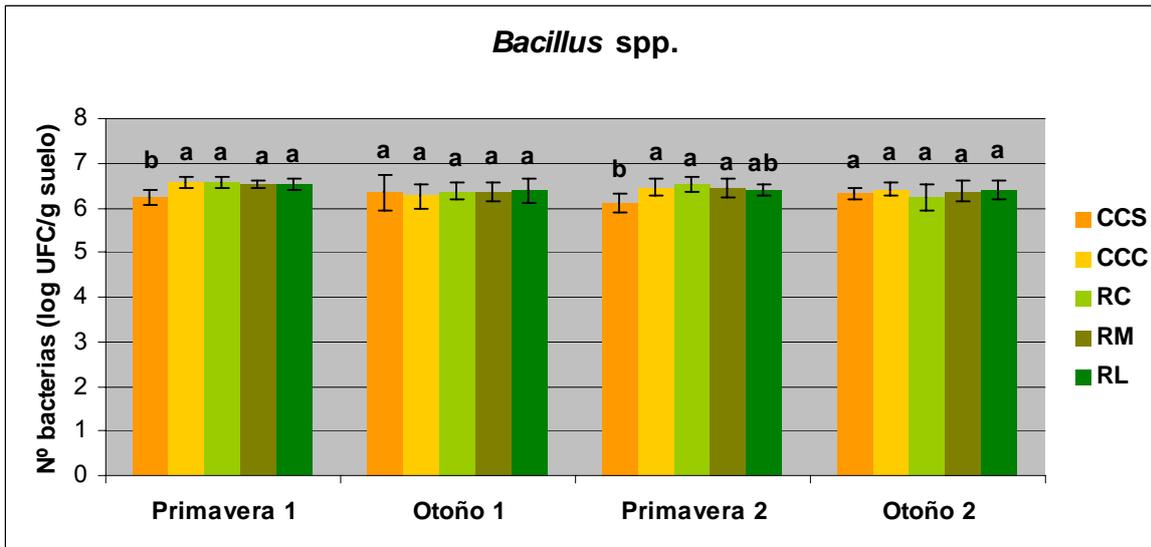
#### 5.1.1 *Ensayo INIA - La Estanzuela*

Las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes fueron las que mostraron mayor variabilidad, en un rango de  $10^3$ - $10^5$  ufc/g de suelo. En el ensayo de INIA - La Estanzuela, sólo se observaron diferencias significativas en los muestreos de otoño, con una menor abundancia de estas bacterias en el tratamiento de cultivo continuo sin fertilización que en los demás tratamientos (figura 3).

La cantidad de esporulados aerobios (principalmente *Bacillus* spp.) se encontró siempre en el orden de  $10^6$  ufc/g suelo. En este grupo de bacterias las diferencias significativas se encontraron en los 2 muestreos de primavera, con una menor abundancia también en el tratamiento de cultivo continuo sin fertilización comparado con los demás tratamientos (figura 4).

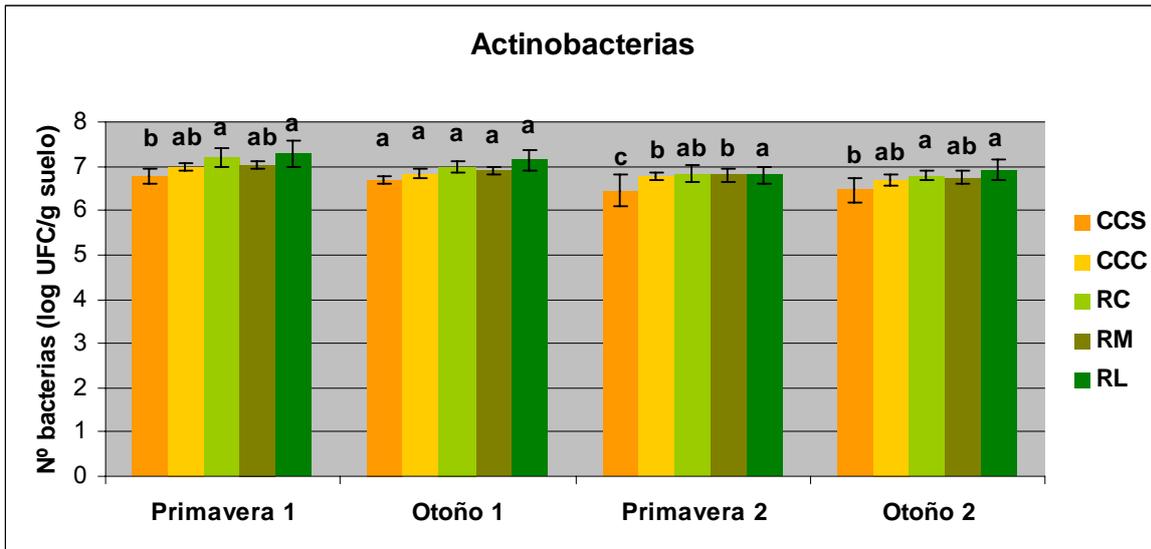


**Figura 3. Poblaciones de *Pseudomonas fluorescentes* en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela en 4 estaciones de muestreo.** Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RC: rotación corta; RM: rotación media; RL: rotación larga. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.



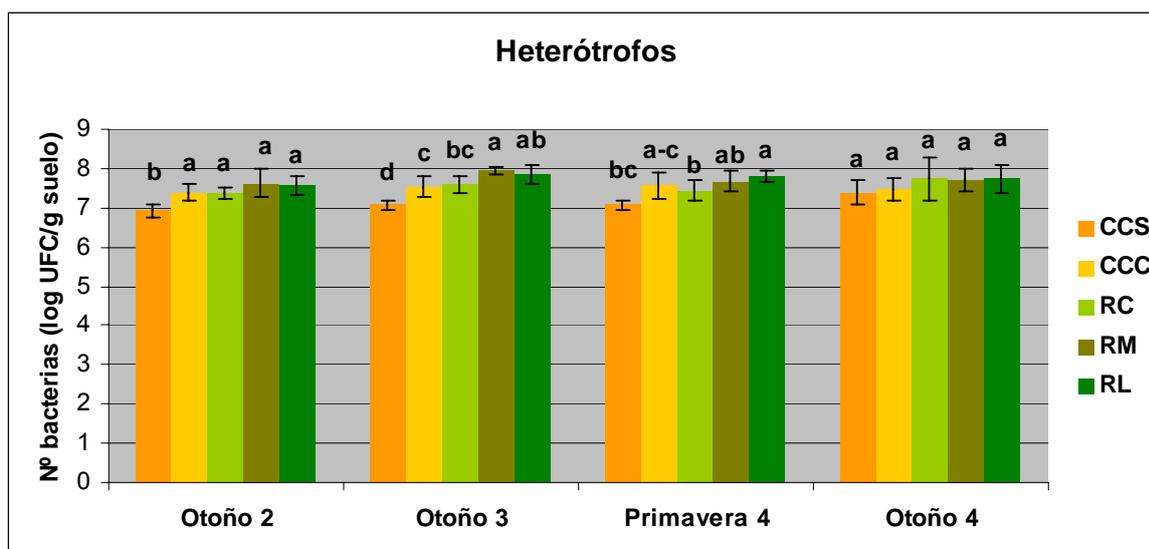
**Figura 4. Poblaciones de *Bacillus* spp. en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela en 4 estaciones de muestreo.** Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RC: rotación corta; RM: rotación media; RL: rotación larga. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.

Para las actinobacterias se registraron valores de  $10^6$ - $10^7$  ufc/g suelo, con poblaciones menores nuevamente en el tratamiento de cultivo continuo sin fertilización y mayores en las rotaciones con mayor y menor porcentaje de pasturas (rotación larga y corta, respectivamente). La rotación media y el tratamiento de cultivo continuo con fertilizantes presentaron poblaciones intermedias e iguales entre sí. Si bien estas tendencias se observaron en las cuatro estaciones de muestreo, en el primer otoño las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (figura 5).

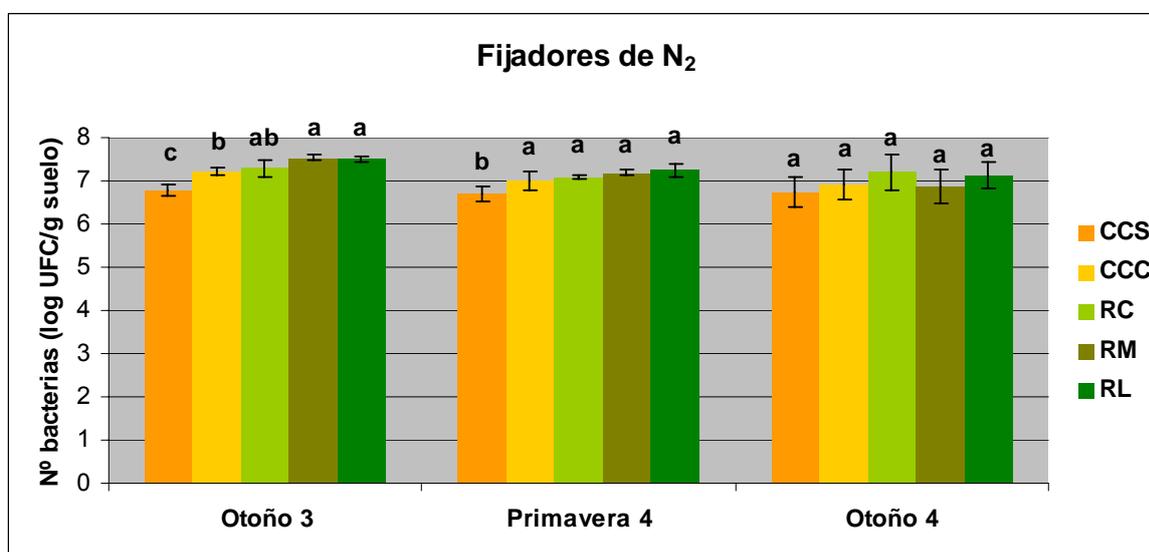


**Figura 5. Poblaciones de actinobacterias en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela en 4 estaciones de muestreo.** Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RC: rotación corta; RM: rotación media; RL: rotación larga. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.

Las poblaciones de bacterias heterótrofas (del orden de  $10^7$  ufc/g suelo) fueron menores en el tratamiento de cultivo continuo sin fertilizantes, aumentando con el agregado de fertilizantes y con la proporción de pasturas en la rotación. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas en 2 de las 4 estaciones de muestreo analizadas (figura 6). La misma tendencia se observó en la abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre (del orden de  $10^6$ - $10^7$  ufc/g suelo), aunque en uno de los 3 muestreos donde se analizó no resultó estadísticamente significativa (figura 7).



**Figura 6.** Poblaciones de bacterias heterótrofas en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela en 4 estaciones de muestreo (otoño 2, otoño 3, primavera 4, otoño 4). Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RC: rotación corta; RM: rotación media; RL: rotación larga. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.



**Figura 7.** Poblaciones de bacterias fijadoras de N en vida libre en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela en 3 estaciones de muestreo (otoño 3, primavera 4, otoño 4). Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RC: rotación corta; RM: rotación media; RL: rotación larga. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.

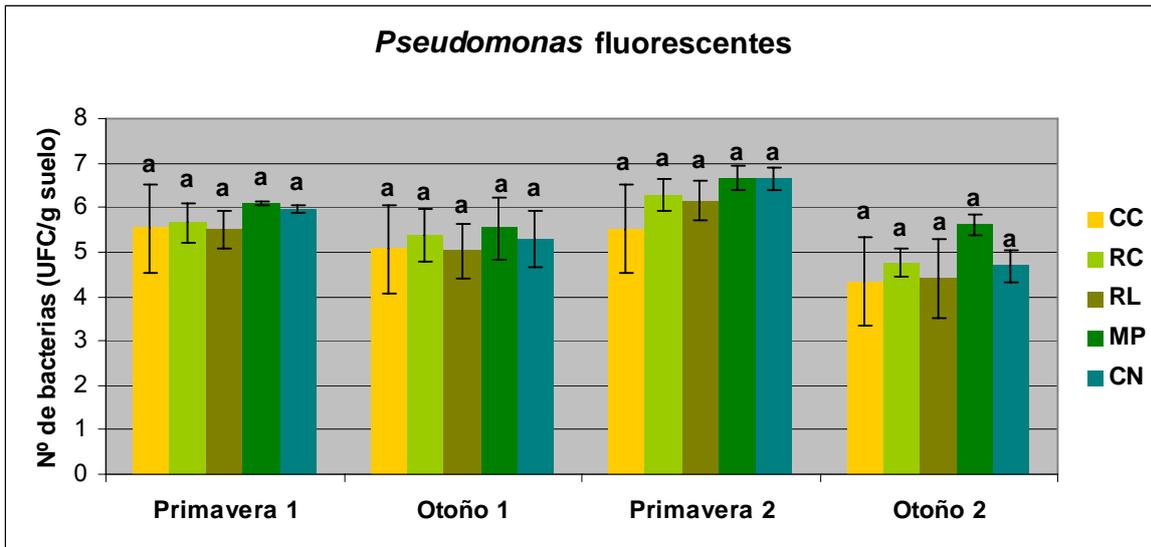
### **5.1.2 Ensayo INIA - Treinta y Tres**

En el ensayo de INIA - Treinta y Tres las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes también mostraron gran variabilidad, encontrándose en un rango de  $10^4$ - $10^6$  ufc/g de suelo. La tendencia indicó una menor abundancia de estas bacterias en el tratamiento de cultivo continuo de granos, intermedia en las rotaciones y mayor en mejoramiento permanente y campo natural. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los muestreos (figura 8).

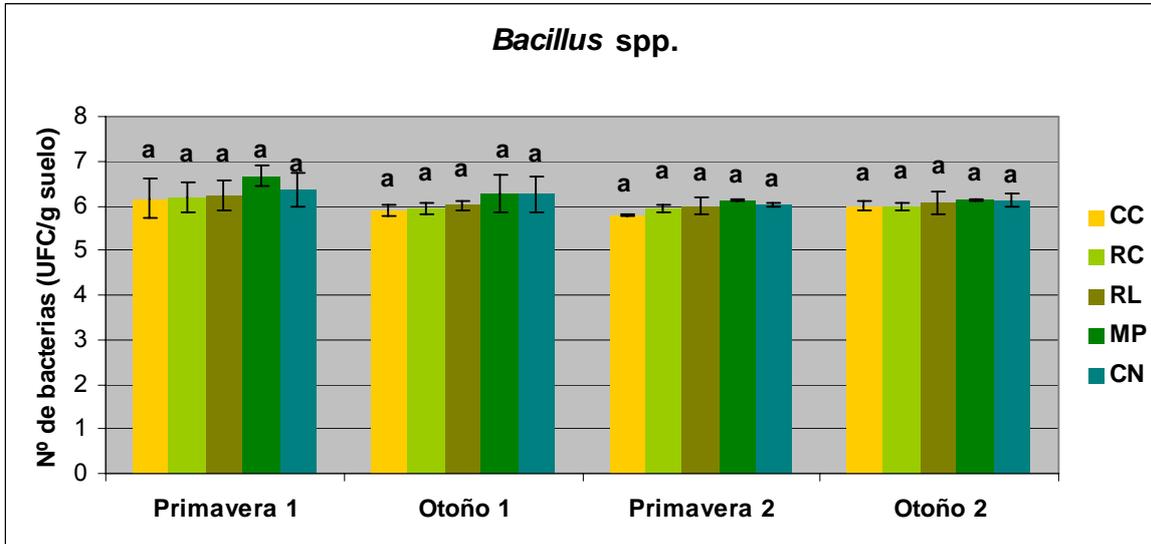
La cantidad de esporulados aerobios se encontró en el rango de  $10^5$ - $10^6$  ufc/g suelo. En este grupo de bacterias no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos del ensayo, aunque se registró la tendencia de una mayor abundancia en el mejoramiento permanente y campo natural, que en las rotaciones y el cultivo continuo (figura 9).

Para las actinobacterias se registraron valores de  $10^6$ - $10^7$  ufc/g suelo, con poblaciones mayores nuevamente en mejoramiento permanente y campo natural, con significancia estadística en las primeras 2 de las 4 estaciones analizadas (figura 10).

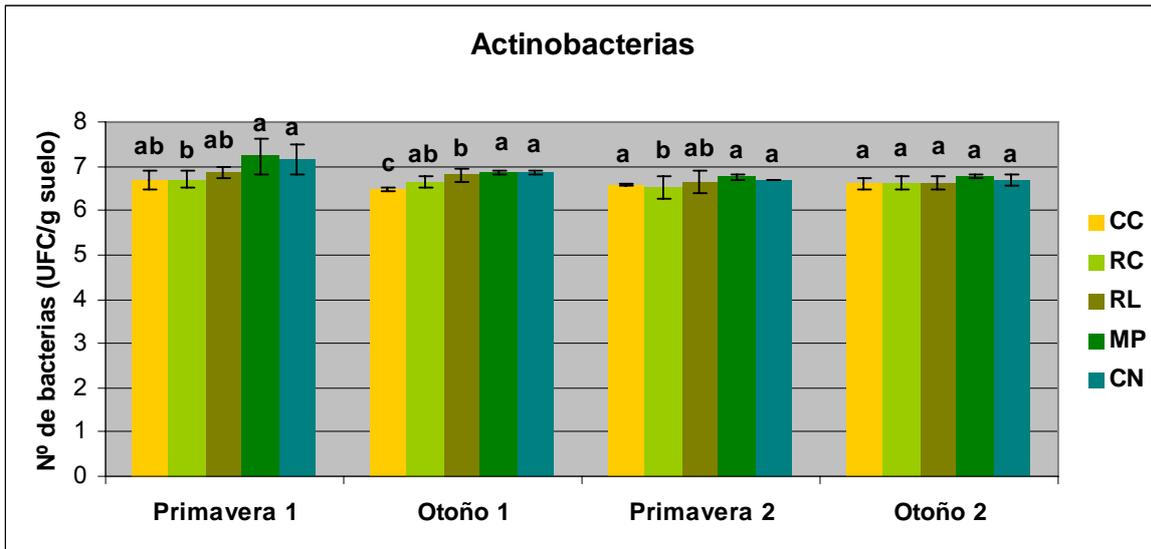
Las poblaciones de bacterias heterótrofas (del orden de  $10^7$  ufc/g suelo) fueron menores en el tratamiento de cultivo continuo, aumentando en las rotaciones y el campo natural, y mayores en el mejoramiento permanente. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas sólo en una de las 4 estaciones de muestreo analizadas (figura 11).



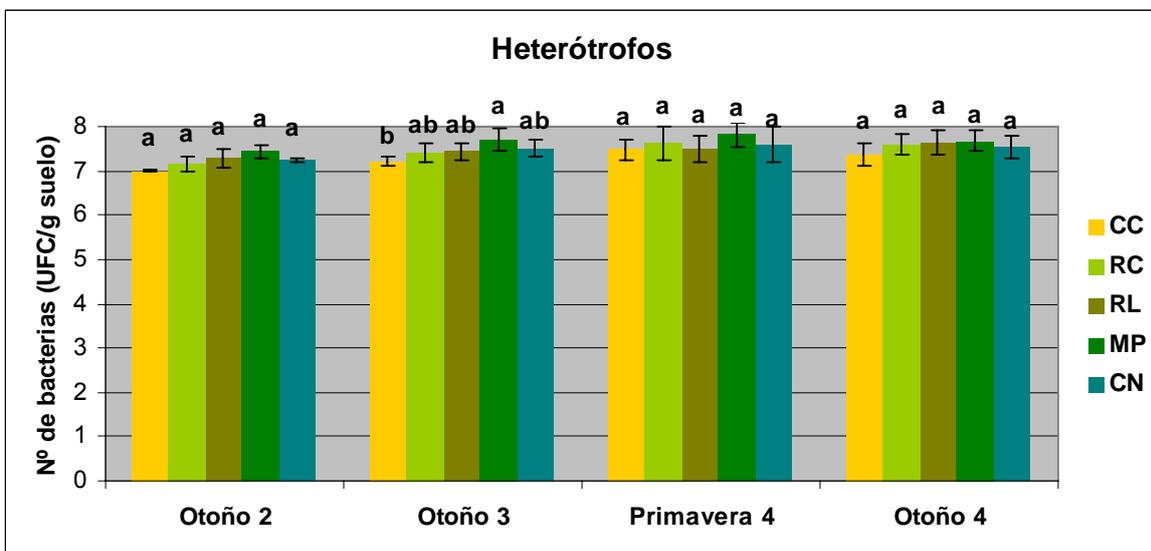
**Figura 8. Poblaciones de *Pseudomonas fluorescentes* en muestras de suelo del ensayo de INIA - Treinta y Tres en 4 estaciones de muestreo.** Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CC: cultivo continuo; RC: rotación corta; RL: rotación larga; MP: mejoramiento permanente de pradera; CN: campo natural. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.



**Figura 9. Poblaciones de *Bacillus spp.* en muestras de suelo del ensayo de INIA - Treinta y Tres en 4 estaciones de muestreo.** Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CC: cultivo continuo; RC: rotación corta; RL: rotación larga; MP: mejoramiento permanente de pradera; CN: campo natural. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.

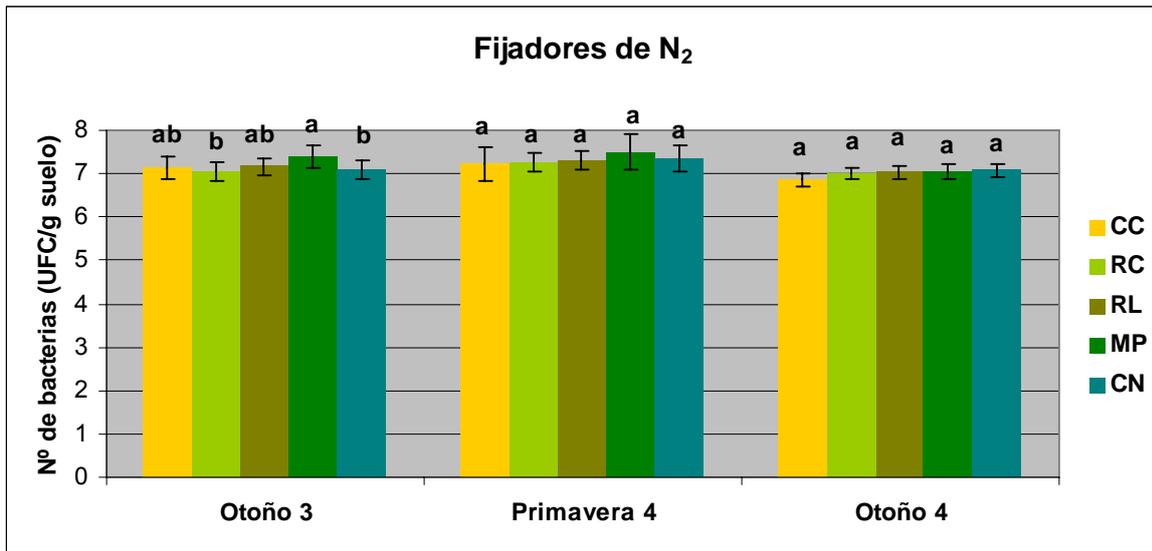


**Figura 10. Poblaciones de actinobacterias en muestras de suelo del ensayo de INIA - Treinta y Tres en 4 estaciones de muestreo.** Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CC: cultivo continuo; RC: rotación corta; RL: rotación larga; MP: mejoramiento permanente de pradera; CN: campo natural. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.



**Figura 11. Poblaciones de bacterias heterótrofas en muestras de suelo del ensayo de INIA - Treinta y Tres en 4 estaciones de muestreo (otoño 2, otoño 3, primavera 4, otoño 4).** Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CC: cultivo continuo; RC: rotación corta; RL: rotación larga; MP: mejoramiento permanente de pradera; CN: campo natural. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.

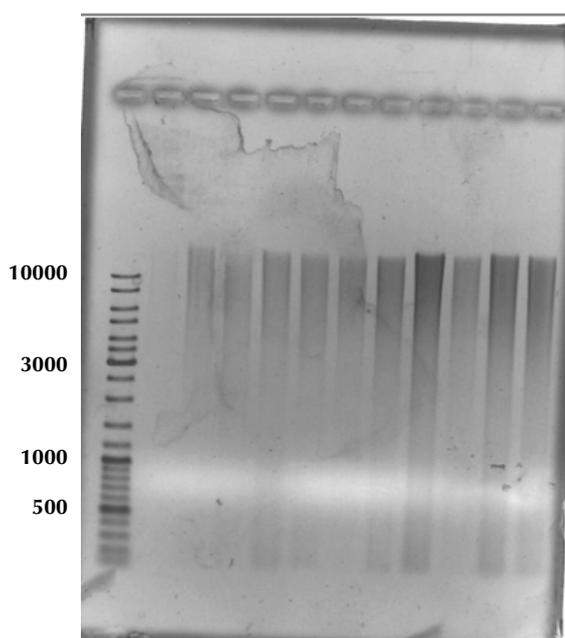
La abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre (del orden de  $10^7$  ufc/g suelo) fue menor en rotación corta y campo natural y mayor en mejoramiento permanente, con diferencias significativas en uno de los 3 muestreos (figura 12).



**Figura 12.** Poblaciones de bacterias fijadoras de N en vida libre en muestras de suelo del ensayo de INIA - Treinta y Tres en 3 estaciones de muestreo (otoño 2, otoño 3, primavera 4, otoño 4). Promedio de la abundancia en los diferentes tratamientos. CC: cultivo continuo; RC: rotación corta; RL: rotación larga; MP: mejoramiento permanente de pradera; CN: campo natural. Letras diferentes representan diferencias significativas dentro del mismo grupo de barras ( $p < 0,05$ ); las barras de error corresponden al desvío estándar.

## 5.2 Estructura de comunidades bacterianas en suelo

La estructura de la comunidad bacteriana total y de ciertas poblaciones se analizó utilizando una metodología independiente de cultivo. A partir de las muestras de suelo se extrajo ADN de alto peso molecular (figura 13), y de concentración y pureza apropiadas para ser utilizado en reacciones de PCR (datos no mostrados).



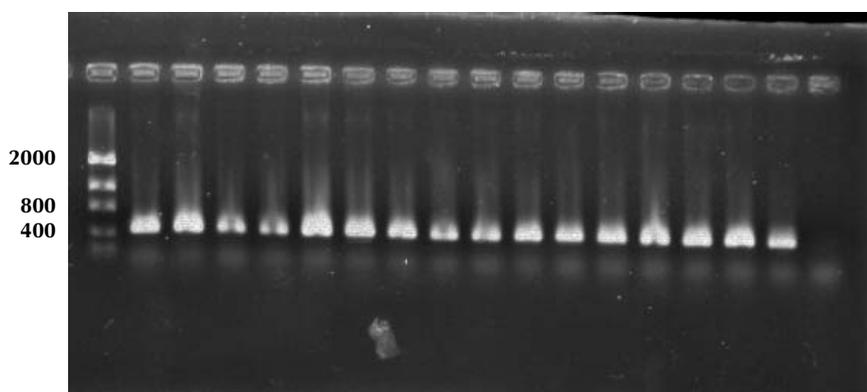
**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de algunas de las extracciones de ADN a partir de muestras de suelo.** Como marcador de peso molecular se utilizó el Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific); se indica el tamaño del fragmento mayor y de las 3 bandas de referencia en pares de bases.

Con el ADN purificado se realizó el análisis por PCR-DGGE del dominio *Bacteria* y del género *Pseudomonas*, y se intentaron ajustar las condiciones de PCR para el género *Bacillus* y el filo *Actinobacteria*. Además de la diversidad estructural se estudió la comunidad diazotrófica total mediante la misma técnica dirigida a un gen funcional (*nifH*).

### 5.2.1 Diversidad del dominio *Bacteria*

Se analizó la estructura de la comunidad del dominio *Bacteria* en ambos ensayos, en los principales tratamientos agrícolas, y en 2 de las estaciones muestreadas.

Se realizaron reacciones de PCR a partir de diluciones del ADN extraído, utilizando cebadores específicos para la región V6-V8 del ARNr 16S, que se unen a las bases 968-984 y 1385-1401 del gen (posiciones correspondientes al gen del ARNr de *E. coli*). Se obtuvo una banda de 473 pb (correspondiente a los 433 pb amplificados por los cebadores más 40 pb de la cola GC), observándose gran variabilidad en la amplificación obtenida para las diferentes muestras (figura 14). Algunas muestras no fueron incluidas en el análisis posterior por haberse obtenido una amplificación insuficiente.



**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para *Bacteria*. 1- Marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen), se indica el tamaño del fragmento mayor y de las 2 bandas más cercanas al amplicón esperado en pares de bases ; 2 a 17- Amplificación a partir del ADN obtenido de muestras de suelo; 18- control negativo de la reacción.

Los productos de PCR se separaron por DGGE, sembrando diferentes volúmenes de cada muestra para igualar la cantidad de ADN por carril.

Los patrones obtenidos presentaron entre 20-40 bandas principales por muestra en el suelo de La Estanzuela y entre 15-30 en Treinta y Tres. Se realizó un análisis de agrupamiento de los patrones de bandas en las muestras utilizando el programa GelCompar, y los resultados se presentan en forma de dendogramas.

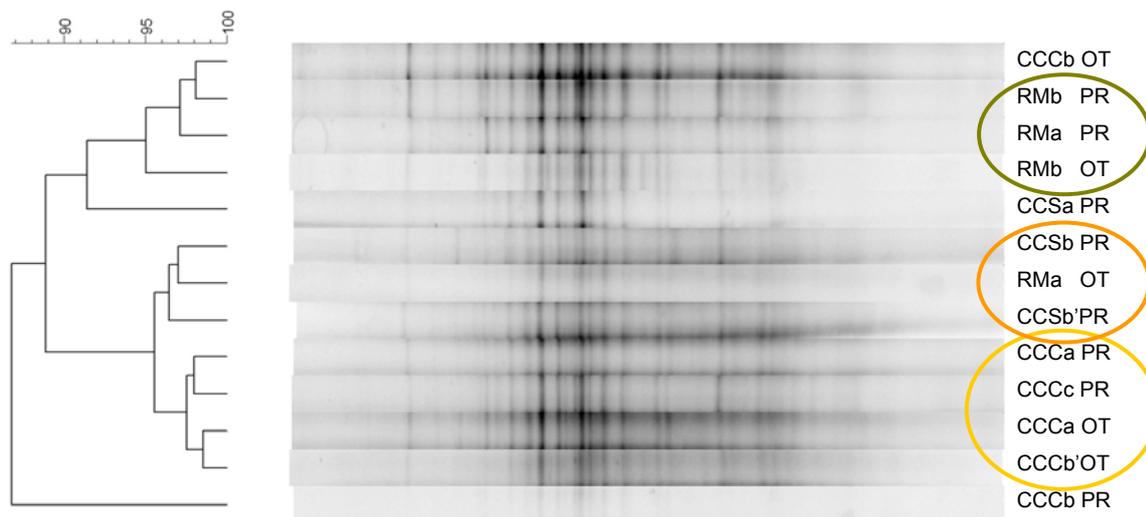
Se observaron comunidades características de cada sitio, ya que en un análisis conjunto de todas las muestras se diferencian 2 agrupamientos correspondientes a los perfiles de Treinta y Tres y de La Estanzuela (figuras 15 y 16).

Se realizaron análisis de agrupamiento independientes para cada sitio y estación de muestreo.

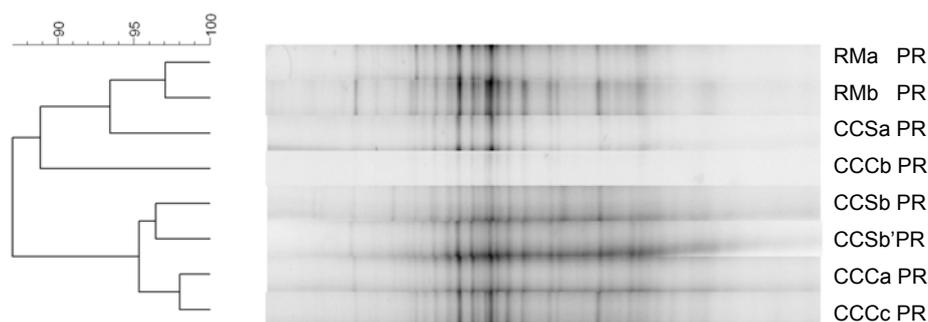
En el ensayo de La Estanzuela, las réplicas de los tratamientos mostraron más de un 95% de similitud entre sí, salvo por las muestras que presentaron poco o mucho ADN debido probablemente a una menor o mayor amplificación en el PCR (CCSaPR, CCCbPR, CCCbOT) que no fueron consideradas en el análisis. Las comunidades bacterianas presentes en los tratamientos con cultivo continuo fueron diferentes a las encontradas en las parcelas con rotación de cultivos. Las muestras de cultivo continuo sin fertilizantes (CCS) presentaron un 95% de similitud con las de cultivo continuo con fertilizantes (CCC), agrupándose entre sí, y presentando menos de un 90% de similitud con las muestras de la rotación media (RM) (figura 15).

Analizando por separado los datos obtenidos en primavera, los resultados fueron similares, salvo por la menor similitud encontrada entre las muestras de cultivo continuo y las de la rotación (85%) (figura 16). La mala amplificación de las

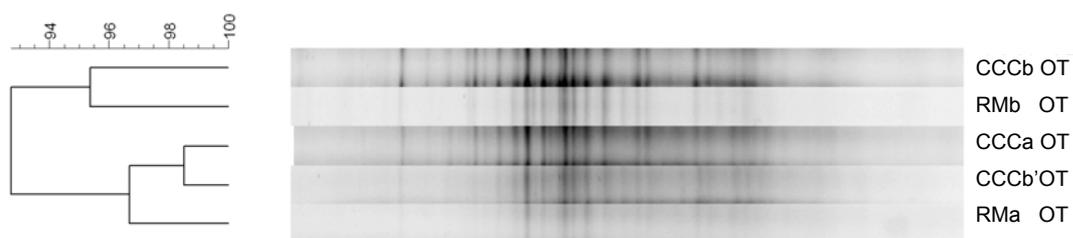
muestras de otoño no permitió realizar un análisis independiente para esta estación; las pocas muestras analizadas resultaron muy similares entre sí (93%) y no se observó diferencia en la composición de la comunidad en relación al tratamiento agrícola (figura 17).



**Figura 15. Análisis por DGGE del dominio *Bacteria* en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela.** Dendrograma generado por el programa GelCompar a partir de los perfiles de bandas obtenidos para cada muestra. Los valores representan la similitud entre las muestras expresada en porcentaje. CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RM: rotación media. a, b y c son repeticiones del mismo tratamiento. OT: otoño; PR: primavera.

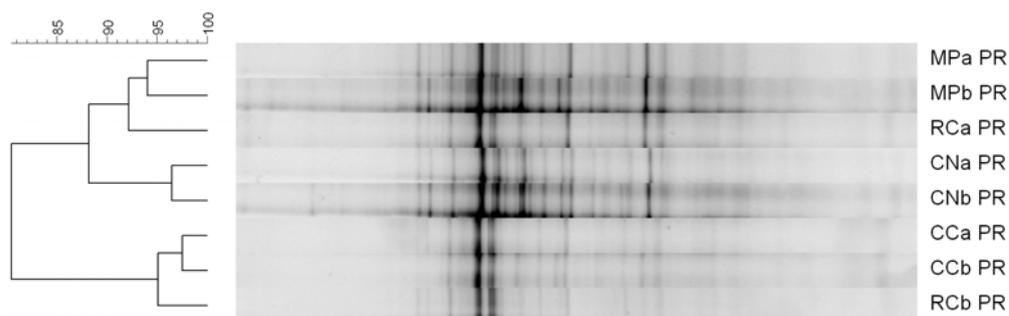


**Figura 16. Análisis por DGGE del dominio *Bacteria* en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela obtenidas en primavera 1.** Dendrograma generado por el programa GelCompar a partir de los perfiles de bandas obtenidos para cada muestra. Los valores representan la similitud entre las muestras expresada en porcentaje. CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RM: rotación media. a, b y c son repeticiones del mismo tratamiento.

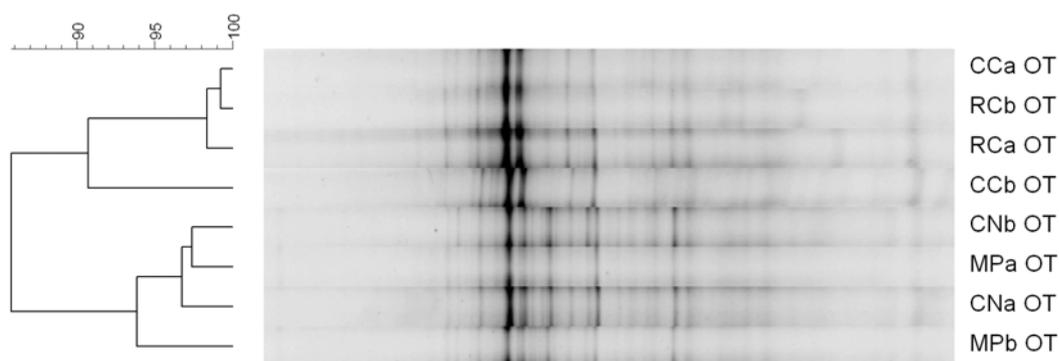


**Figura 17. Análisis por DGGE del dominio *Bacteria* en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela obtenidas en otoño 1.** Dendrograma generado por el programa GelCompar a partir de los perfiles de bandas obtenidos para cada muestra. Los valores representan la similitud entre las muestras expresada en porcentaje. CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RM: rotación media. a, b y c son repeticiones del mismo tratamiento.

En el Ensayo de INIA - Treinta y Tres, las réplicas de los distintos tratamientos también se agruparon con un porcentaje de similitud de alrededor de 95%, salvo por las muestras correspondientes a la rotación en primavera, que no se agruparon juntas. Se observó una clara relación entre la estructura de la comunidad de *Bacteria* y el tratamiento agronómico. La estructura de la comunidad bacteriana en campo natural (CN) resultó similar a la encontrada en el mejoramiento permanente (MP) de pasturas, con una similitud de 88% en primavera y 94% en otoño, pero bien diferenciadas si se compara entre estaciones. Por otra parte, las comunidades bajo cultivo continuo (CC) fueron más similares a las encontradas en la rotación corta (RC), con similitudes de 95% en primavera y 90% en otoño. El grupo conteniendo muestras de CN y MP presentó una similitud con el grupo de CC y RC de 80% en primavera y 85% en otoño. En este último grupo se observó una menor equitatividad en términos de diversidad, ya que presentó 3 bandas dominantes y varias bandas con menor intensidad que en las demás muestras (figuras 18 y 19).



**Figura 18. Análisis por DGGE del dominio *Bacteria* en muestras de suelo del ensayo de INIA - Treinta y Tres obtenidas en primavera 1.** Dendograma generado por el programa GelCompar a partir de los perfiles de bandas obtenidos para cada muestra. Los valores representan la similitud entre las muestras expresada en porcentaje. CC: cultivo continuo; RC: rotación corta; MP: mejoramiento permanente de pradera; CN: campo natural. a y b son repeticiones del mismo tratamiento.



**Figura 19. Análisis por DGGE del dominio *Bacteria* en muestras de suelo del ensayo de INIA - Treinta y Tres obtenidas en otoño 1.** Dendograma generado por el programa GelCompar a partir de los perfiles de bandas obtenidos para cada muestra. Los valores representan la similitud entre las muestras expresada en porcentaje. CC: cultivo continuo; RC: rotación corta; MP: mejoramiento permanente de pradera; CN: campo natural. a y b son repeticiones del mismo tratamiento.

Se calcularon métricas de diversidad a partir de los datos de DGGE, considerando la intensidad de las bandas como medida de la abundancia de cada bacteria amplificada. En el ensayo de INIA - La Estanzuela, el tratamiento en que la diversidad fue mayor de acuerdo a los índices de Shannon y Simpson, fue el de cultivo continuo sin fertilizantes. El de cultivo continuo con fertilizantes y la

rotación media presentaron valores similares de diversidad, en ambas estaciones de muestreo. La medida de equitatividad fue mayor bajo cultivo continuo con fertilizantes, seguido de la rotación, y menor bajo cultivo continuo sin fertilizantes (tabla 4).

**Tabla 4.** Índices de diversidad del dominio *Bacteria* a partir de los resultados de DGGE del ensayo de INIA - La Estanzuela, en primavera y otoño.

ÍNDICE de DIVERSIDAD	PRIMAVERA			OTOÑO	
	CCS	CCC	RM	CCC	RM
Shannon (H)	3,278	3,0885	3,0745	3,1945	3,1815
Simpson (1-D)	0,95435	0,9499	0,9488	0,9555	0,95305
Equitatividad (e <sup>H/S</sup> )	0,813	0,8896	0,8664	0,9039	0,8461

CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RM: rotación media.

En el ensayo de INIA - Treinta y Tres se encontró una mayor diversidad de la comunidad bacteriana en el mejoramiento permanente y en campo natural respecto a los otros tratamientos. En primavera fueron similares los valores encontrados en MP y CN, mientras que en otoño fue mayor la diversidad en CN que en MP. A su vez, la diversidad en la rotación corta fue mayor que bajo cultivo continuo. Los resultados de equitatividad fueron diferentes en primavera y otoño, pero el menor valor fue en el tratamiento de cultivo continuo, en ambas estaciones (tabla 5).

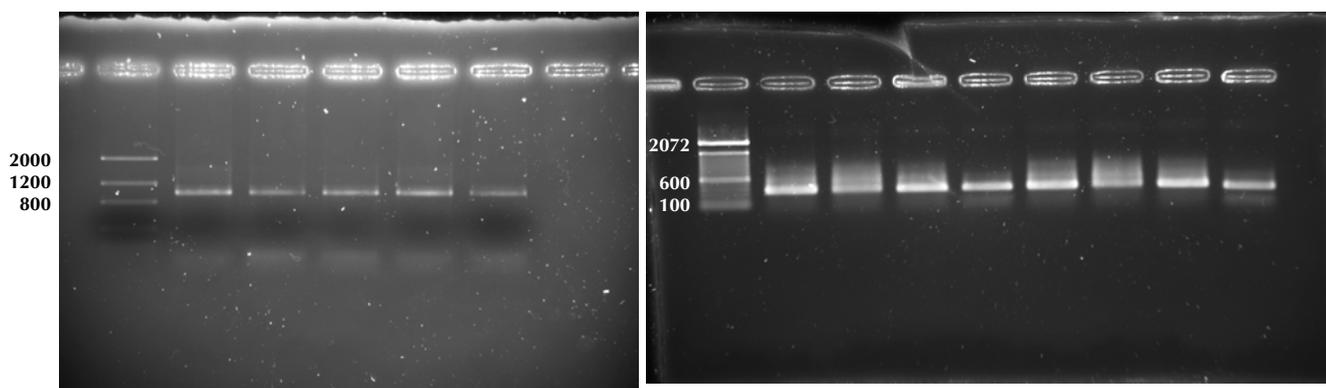
**Tabla 5.** Índices de diversidad del dominio *Bacteria* a partir de los resultados de DGGE del ensayo de INIA - Treinta y Tres, en primavera y otoño.

ÍNDICE de DIVERSIDAD	PRIMAVERA				OTOÑO			
	CC	RC	MP	CN	CC	RC	MP	CN
Shannon(H)	2,7465	2,736	3,1465	3,1325	2,4555	2,5325	2,779	3,0055
Simpson (1-D)	0,92535	0,93045	0,9544	0,95165	0,90115	0,91035	0,92915	0,9475
Equitatividad (e <sup>H/S</sup> )	0,8661	0,93875	0,9368	0,908	0,865	0,89905	0,87975	0,9415

CC: cultivo continuo; RC: rotación corta; MP: mejoramiento permanente; CN: campo natural

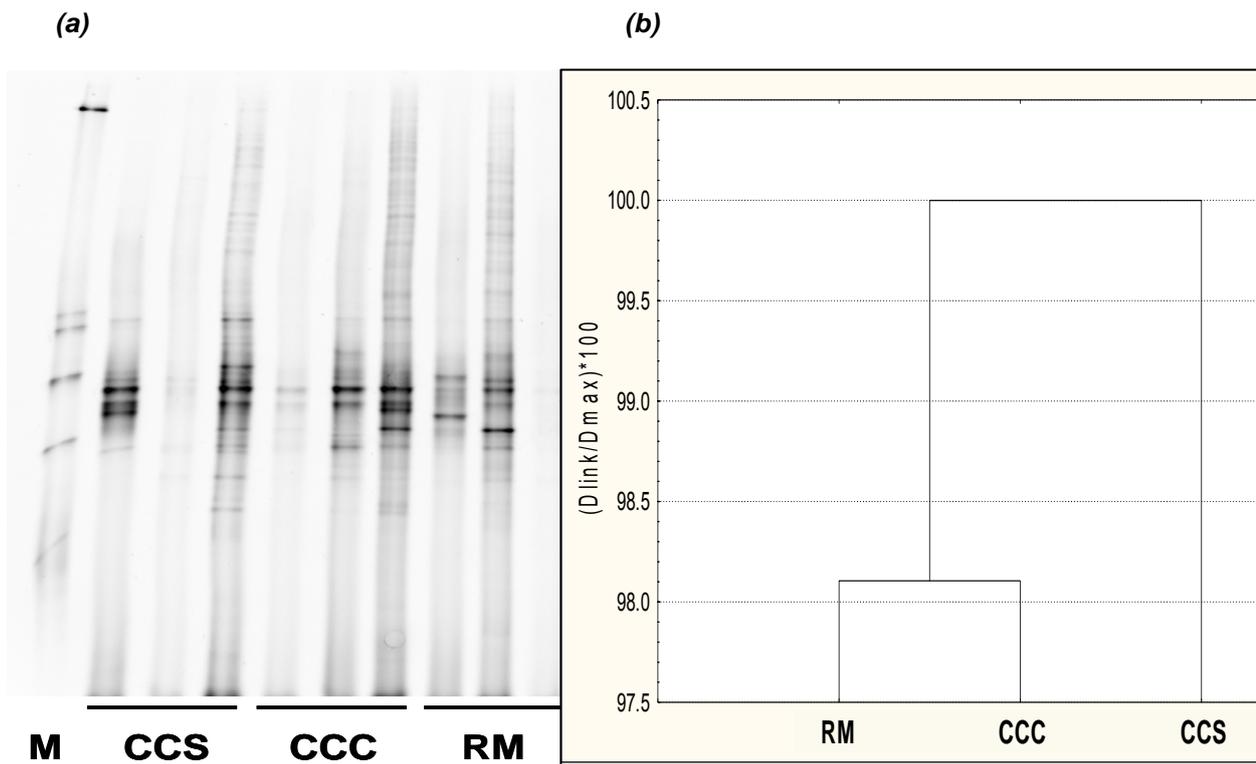
### 5.2.2 Diversidad del género *Pseudomonas*

A partir del ADN extraído se realizaron reacciones de PCR semi-anidado, para amplificar la región V6-V7 del ARNr 16S de bacterias del género *Pseudomonas*. En el primer paso -con cebadores específicos para el género- se obtuvieron bandas de 990 pb (figura 20a) y en el segundo paso -con un cebador específico y otro universal conteniendo una cola GC- se amplificaron fragmentos de 300 pb (figura 20b). Aunque en algunos casos en el primer paso se obtuvo una amplificación muy débil, se obtuvo buena cantidad de producto en el segundo paso. Para algunas muestras la segunda reacción mostró bandas de amplificación inespecíficas.



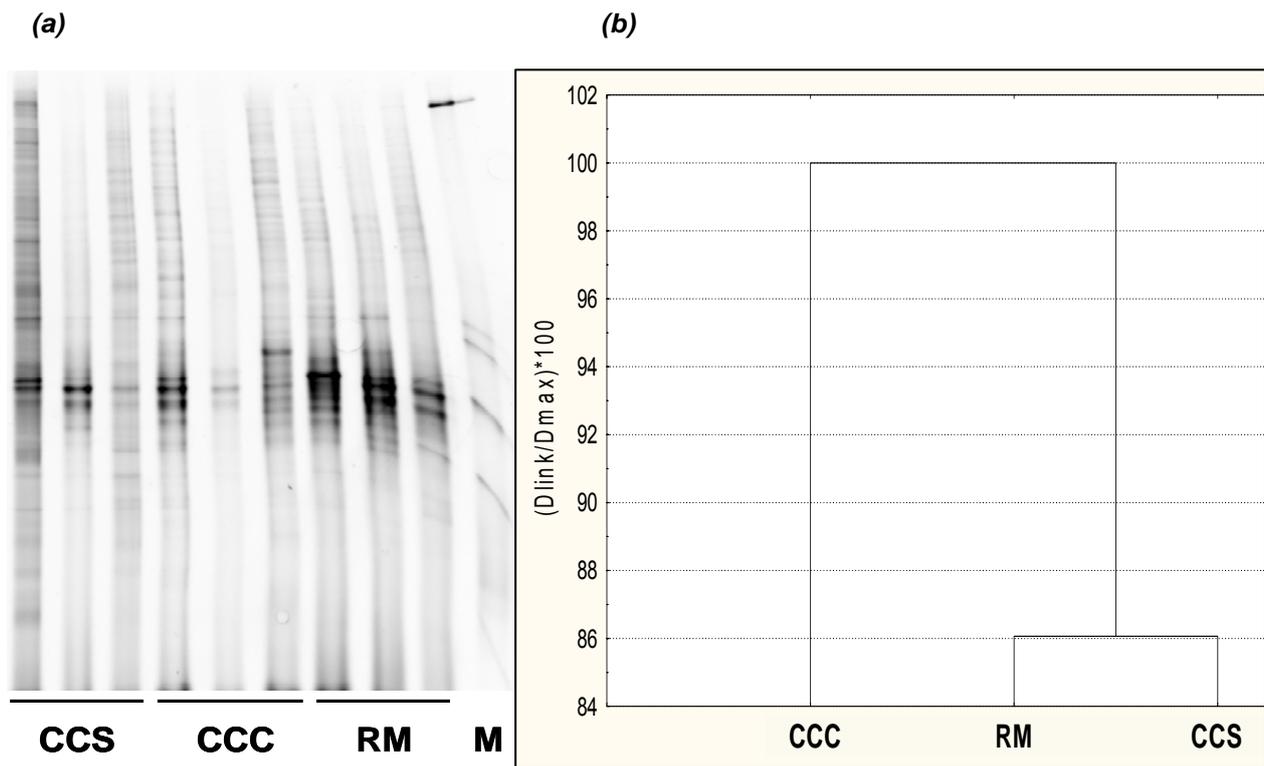
**Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para *Pseudomonas* spp. Izquierda (a): primer paso. 1-** Marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen), se indica el tamaño del fragmento mayor y de las 2 bandas más cercanas al amplicón esperado en pares de bases; **2 a 6-** Amplificación a partir del ADN obtenido de muestras de suelo; **7-** control negativo de la reacción. **Derecha (b): segundo paso. 1-** Control negativo de la reacción; **2-** Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), se indica el tamaño del fragmento mayor y de las 2 bandas más cercanas al amplicón esperado en pares de bases; **3 a 10-** Amplificación a partir del ADN obtenido de muestras de suelo.

Por análisis visual se detectó una mayor variabilidad de los patrones de bandas correspondientes a distintas repeticiones y tratamientos respecto a lo observado con el dominio *Bacteria* (figuras 21a y 22a).



**Figura 21. Análisis por DGGE del género *Pseudomonas* en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela en primavera. (a)** Gel obtenido para 3 repeticiones de los tratamientos cultivo continuo sin fertilizantes (CCS), cultivo continuo con fertilizantes (CCC) y rotación media (RM). M: marcador de migración. **(b)** Dendrograma realizado con el programa Statistica, combinando las 3 repeticiones. En el eje y se grafica la distancia de agrupamiento en relación a la máxima distancia obtenida, expresada en porcentaje.

El análisis de agrupamiento de las muestras de INIA - La Estanzuela por separado no presentó relación con el tratamiento, probablemente debido a dicha variabilidad. Combinado las 3 repeticiones de cada tratamiento (Aboim et al. 2008), se observó que en primavera la estructura de la comunidad de *Pseudomonas* spp. en la rotación se pareció más a la presente bajo cultivo continuo con fertilizantes que sin agregado de fertilizantes (figura 21b). En otoño, en cambio la composición de este grupo en la rotación fue más parecido al de cultivo continuo sin fertilizantes que con agregado de fertilizantes (figura 22b).



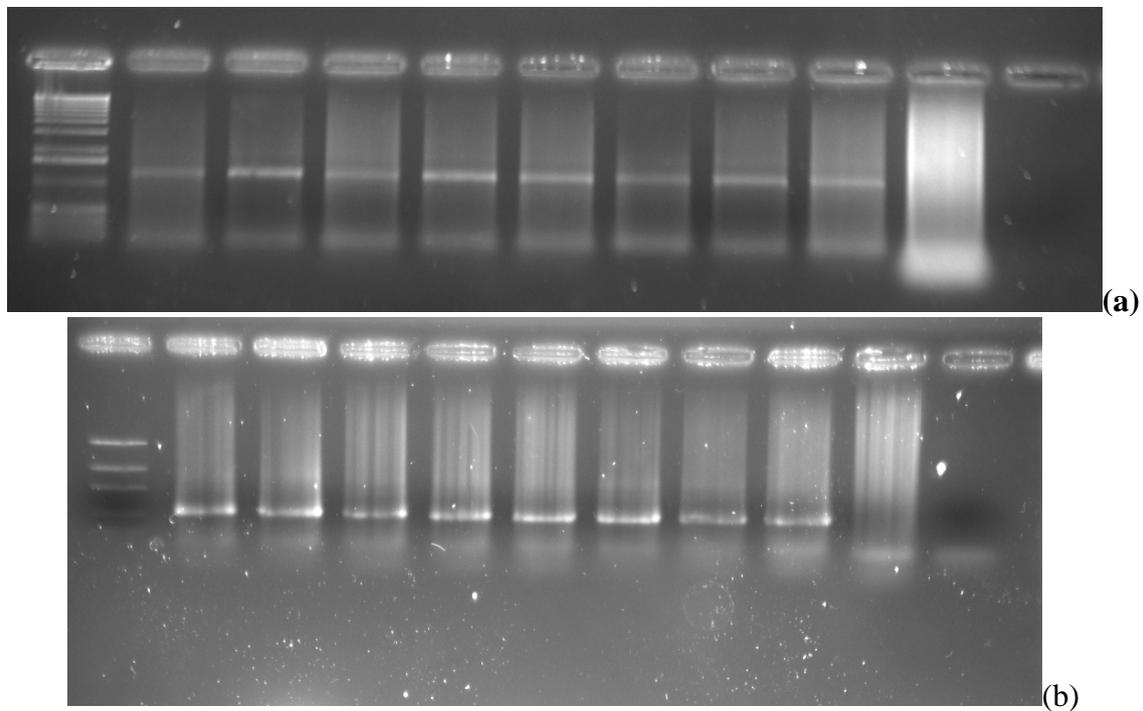
**Figura 22. Análisis por DGGE del género *Pseudomonas* en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela en otoño. (a)** Gel obtenido para 3 repeticiones de los tratamientos cultivo continuo sin fertilizantes (CCS), cultivo continuo con fertilizantes (CCC) y rotación media (RM). M: marcador de migración. **(b)** Dendrograma realizado con el programa Statistica, combinando las 3 repeticiones. En el eje y se grafica la distancia de agrupamiento en relación a la máxima distancia obtenida, expresada en porcentaje.

En el análisis de la estructura de la comunidad de *Pseudomonas* spp. del ensayo realizado en Treinta y Tres los resultados de la amplificación y de la DGGE no fueron suficientemente satisfactorios para su análisis.

### 5.2.3 Diversidad del género *Bacillus* spp. y el filo *Actinobacteria*

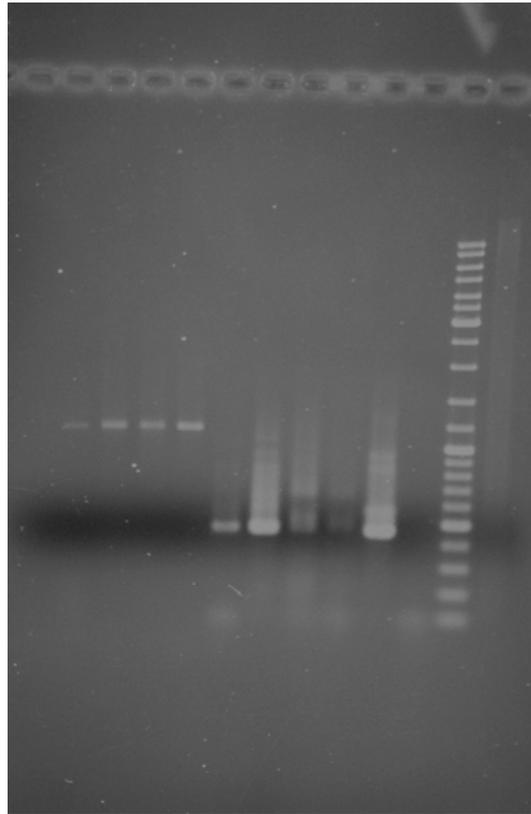
Se realizaron reacciones de PCR semi-anidadas, para amplificar la región 5' del gen del ARNr 16S de *Bacillus* spp. En el primer paso -con un cebador específico para este grupo y otro universal- se obtuvieron bandas de 1300 pb y en el segundo paso –

con los cebadores para *Bacteria*- se amplificaron fragmentos de 473 pb. Además de la banda esperada, en ambos pasos se obtuvo amplificación inespecífica (figura 23).



**Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para *Bacillus* spp. Arriba (a): primer paso. 1-** Marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen); **2 a 10-** Amplificación a partir del ADN obtenido de muestras de suelo; **11-** Control negativo de la reacción. **Abajo (b): segundo paso. 1-** Marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen); **2 a 10-** Amplificación a partir del ADN obtenido de muestras de suelo; **11-** control negativo de la reacción.

Cuando se analizaron los productos de PCR por DGGE, las bandas obtenidas no resultaron nítidas, lo que no permitió caracterizar los patrones de bandas para este grupo de bacterias. Algo similar ocurrió en la amplificación del gen del ARNr 16S de *Actinobacteria*, obteniéndose una banda de 1275 pb en la primera reacción y otra de 473 pb en la segunda además de bandas inespecíficas (figura 24).

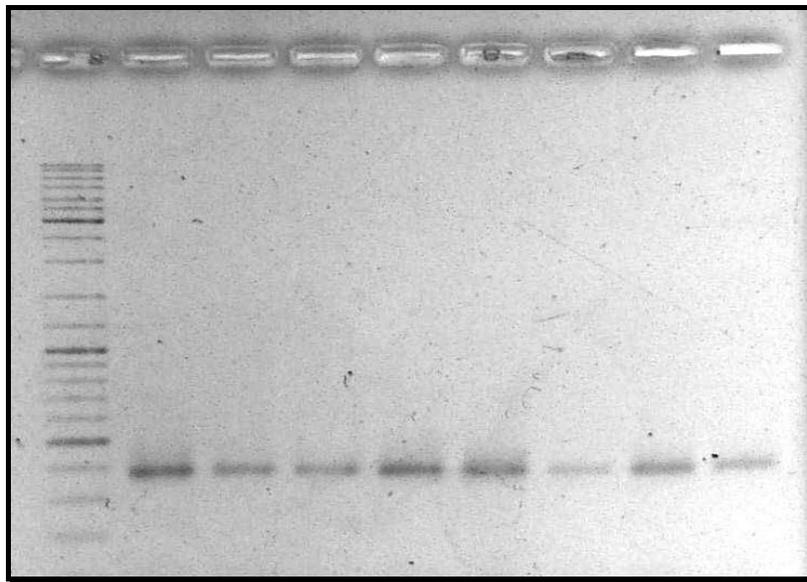


**Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para *Actinobacteria*. 1 a 5- Primer paso; 6 a 10- Segundo paso; 12- Marcador de peso molecular GeneRuler™ Ladder Mix (Fermentas); 11 y 13- Controles negativos de las reacciones.

#### **5.2.4 Diversidad de las bacterias fijadoras de nitrógeno**

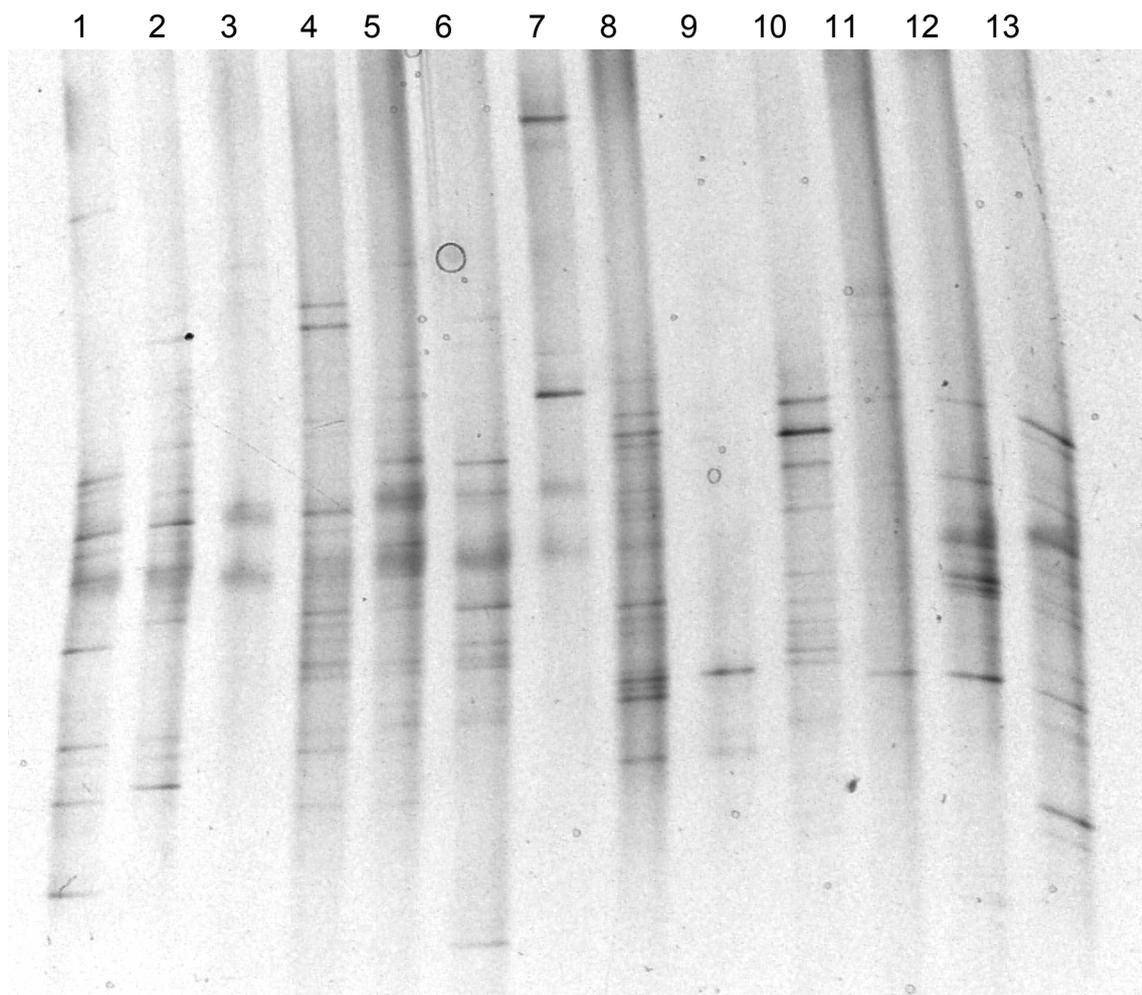
Se estudió la estructura de la comunidad bacteriana diazotrófica en las muestras de ambos ensayos obtenidas en primavera 4, analizando por DGGE la diversidad de un fragmento del gen *nifH* amplificado por PCR, adaptando el protocolo descrito por Demba Diallo et al. (2004). Se utilizaron dos pares de cebadores, en una reacción anidada para aumentar la sensibilidad de la amplificación, ya que con un solo paso no se obtuvo suficiente cantidad de producto (no es visible en un gel de electroforesis en agarosa). Se probaron diferentes condiciones de reacción de PCR variando la concentración de ADN molde, la temperatura de hibridación y el

agregado de formamida o DMSO a la mezcla de reacción. Finalmente, la condición en la que se obtuvo mayor cantidad de producto en el segundo paso (370 pb) y de forma más específica fue con el agregado de DMSO y un programa de PCR con 2 temperaturas de hibridación (figura 25). Sin embargo, no se obtuvieron productos de amplificación para todas las muestras y la cantidad de amplicón obtenido en algunos casos fue escaso, especialmente en los tratamientos del ensayo realizado en INIA - Treinta y Tres.



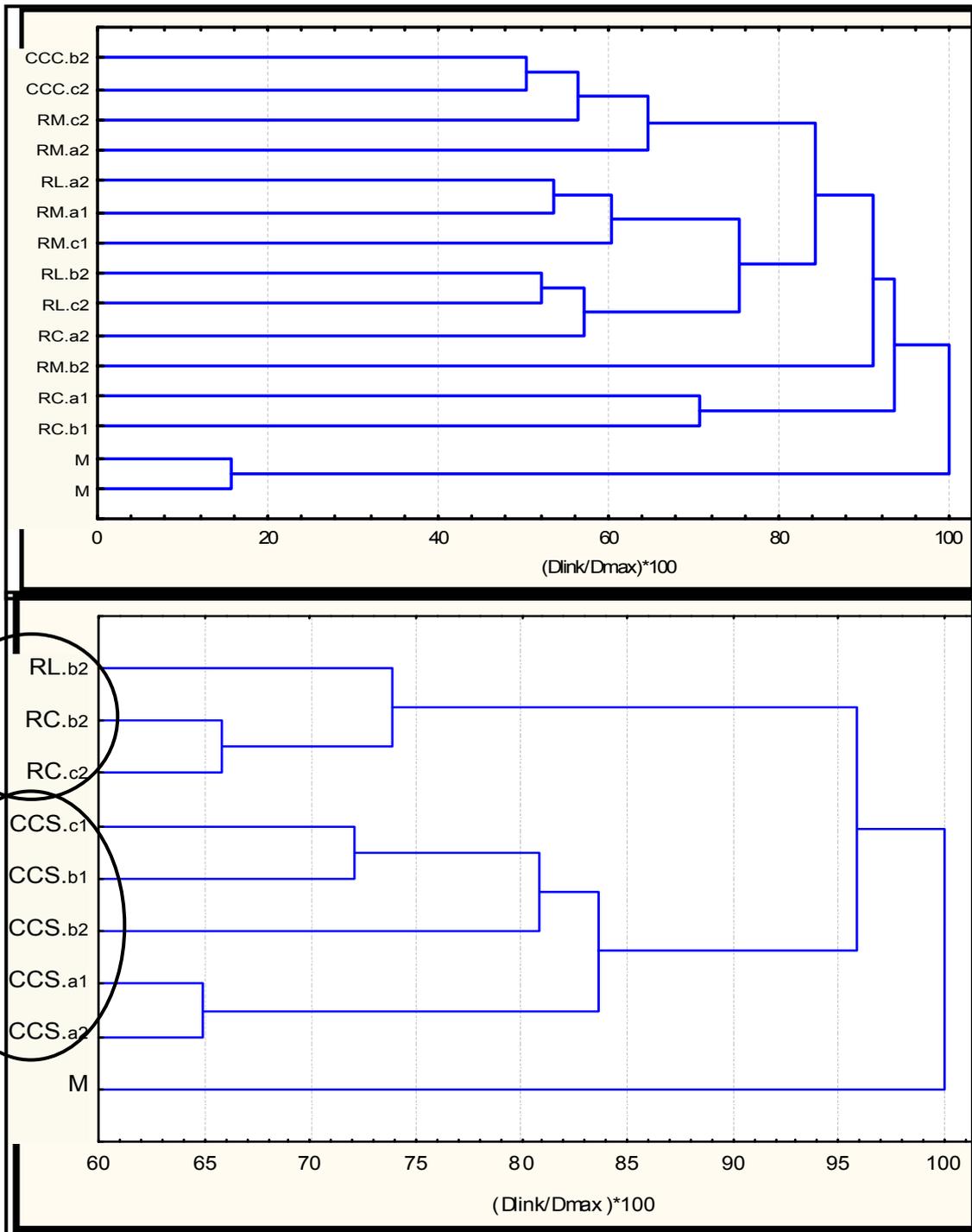
**Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa de productos del segundo paso de PCR para las bacterias fijadoras de nitrógeno. 1-** Marcador de peso molecular GeneRuler™ Ladder Mix (Fermentas) de 10.000 – 100 pb; **2 a 9-** Productos de amplificación del gen *nifH* a partir de ADN extraído de suelo (320 pb).

De la totalidad de 60 muestras colectadas, sólo se pudieron analizar 30 por DGGE en 3 corridas electroforéticas independientes, donde se observaron entre 30 a 50 bandas diferentes por carril (figura 26). Se realizaron análisis de agrupamiento de las mismas de acuerdo a la presencia o ausencia de bandas, para comparar la estructura de la comunidad presente en ellas.



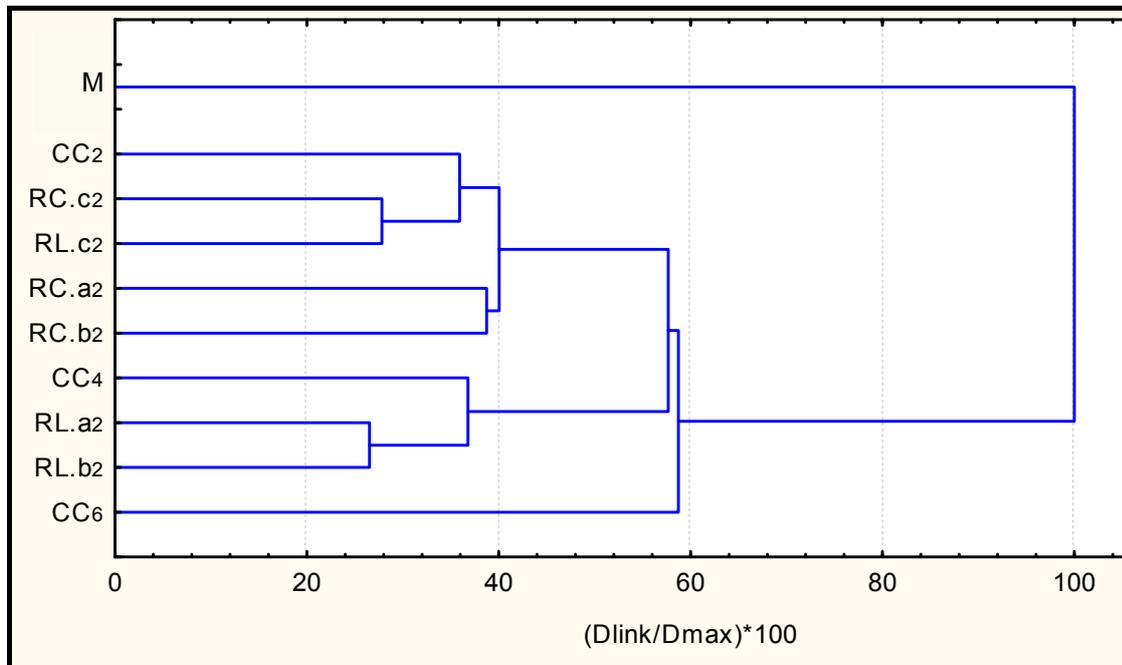
**Figura 26. Análisis por DGGE de las bacterias fijadoras de nitrógeno.** Gel de DGGE de los productos de PCR del gen *nifH* a partir de muestras de suelo. Se incluyó un marcador de migración en el carril 7.

En el ensayo que se lleva a cabo en INIA - La Estanzuela, se observó una diferencia en la estructura de la comunidad diazotrófica entre el tratamiento de cultivo continuo sin fertilizantes y las rotaciones (figura 27b). Sin embargo, la misma no se diferenció bajo cultivo continuo con fertilización y los tratamientos de rotaciones (figura 27a).



**Figura 27. Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad diazotrófica en muestras de suelo del ensayo de INIA - La Estanzuela obtenidas en primavera 4.** Dendogramas generados por el programa Statistica a partir de los perfiles de bandas obtenidos por DGGE para cada muestra. CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RC: rotación corta; RM: rotación media; RL: rotación larga; a, b, c: repeticiones del mismo tratamiento (diferentes parcelas); 1, 2: duplicados dentro de cada parcela; M: marcador de migración. En el eje x se grafica la distancia de agrupamiento en relación a la máxima distancia obtenida en cada análisis, expresada en porcentaje.

En el análisis de las muestras del ensayo de INIA - Treinta y Tres la estructura de la comunidad diazotrófica no se relacionó al tratamiento agrícola, ya que las réplicas de los diferentes tratamientos no se agruparon en el dendograma (figura 28).



**Figura 28. Análisis de agrupamiento de la estructura de la comunidad diazotrófica en muestras de suelo del ensayo de INIA - Treinta y Tres en primavera 4.** Dendogramas generados por el programa Statistica a partir de los perfiles de bandas obtenidos por DGGE para cada muestra. a, b y c: triplicados de cada tratamiento (diferentes parcelas); 2, 4 y 6: réplicas dentro de cada parcela. CC: Cultivo continuo; RC: Rotación corta; RL: rotación larga; a, b, c: repeticiones del mismo tratamiento (diferentes parcelas); 1-6: réplicas dentro de cada parcela; M: marcador de migración. En el eje x se grafica la distancia de agrupamiento en relación a la máxima distancia, expresada en porcentaje.

### **5.3 Relaciones entre variables microbiológicas, físicas y químicas del suelo**

Se analizaron las relaciones entre las variables microbiológicas y fisicoquímicas del suelo en 6 estaciones de muestreo, mediante análisis de componentes principales, que resultó el más apropiado de acuerdo al gradiente de recambio de las variables.

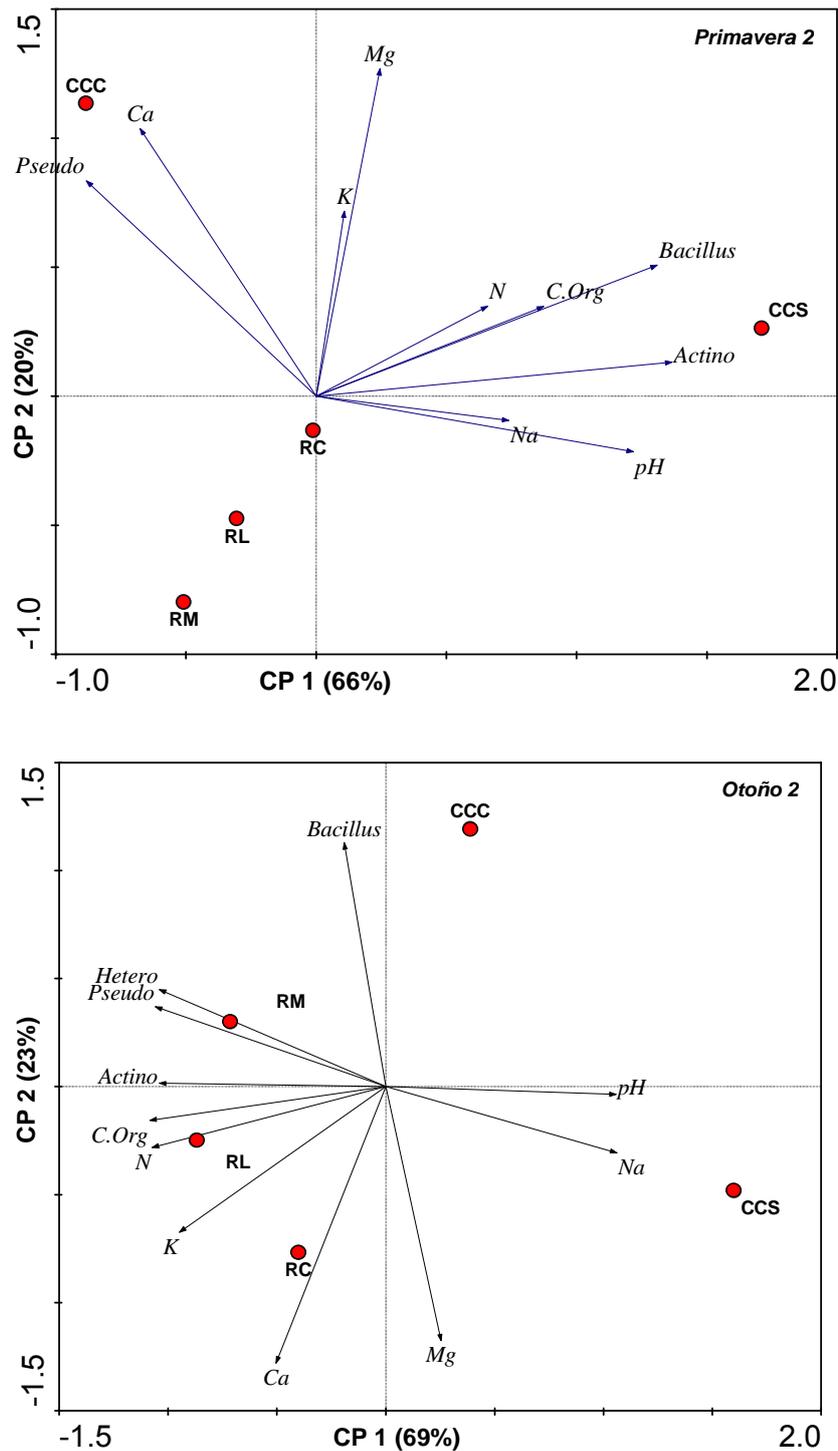
En el ensayo de La Estanzuela, en las 6 estaciones analizadas, las muestras de los tratamientos de cultivo continuo (CC) se ubicaron separadas de las rotaciones, por el primer eje en la mayoría de los casos, salvo en la primavera 2 que fue por el segundo eje (figuras 29 y 30). En general, se observó un mayor aporte a la formación del primer eje de las variables microbiológicas (abundancia de los diferentes grupos de bacterias), de los nutrientes (C, N y P) y del pH.

En la primavera 1, el segundo eje separó la rotación corta que se encontraba al final de la fase de pasturas y el tratamiento de CC con fertilizantes, del CC sin fertilizantes y las otras rotaciones que estaban al final de la fase de cultivo (figura 29, arriba). En la primavera 2, el primer eje separó el CC sin fertilizantes del resto de los tratamientos (figura 30, arriba). En el otoño 2 el segundo eje separó las muestras de CC con fertilizantes de las de CC sin fertilizantes, y las muestras de rotación larga y corta de las de rotación media (figura 30, abajo).

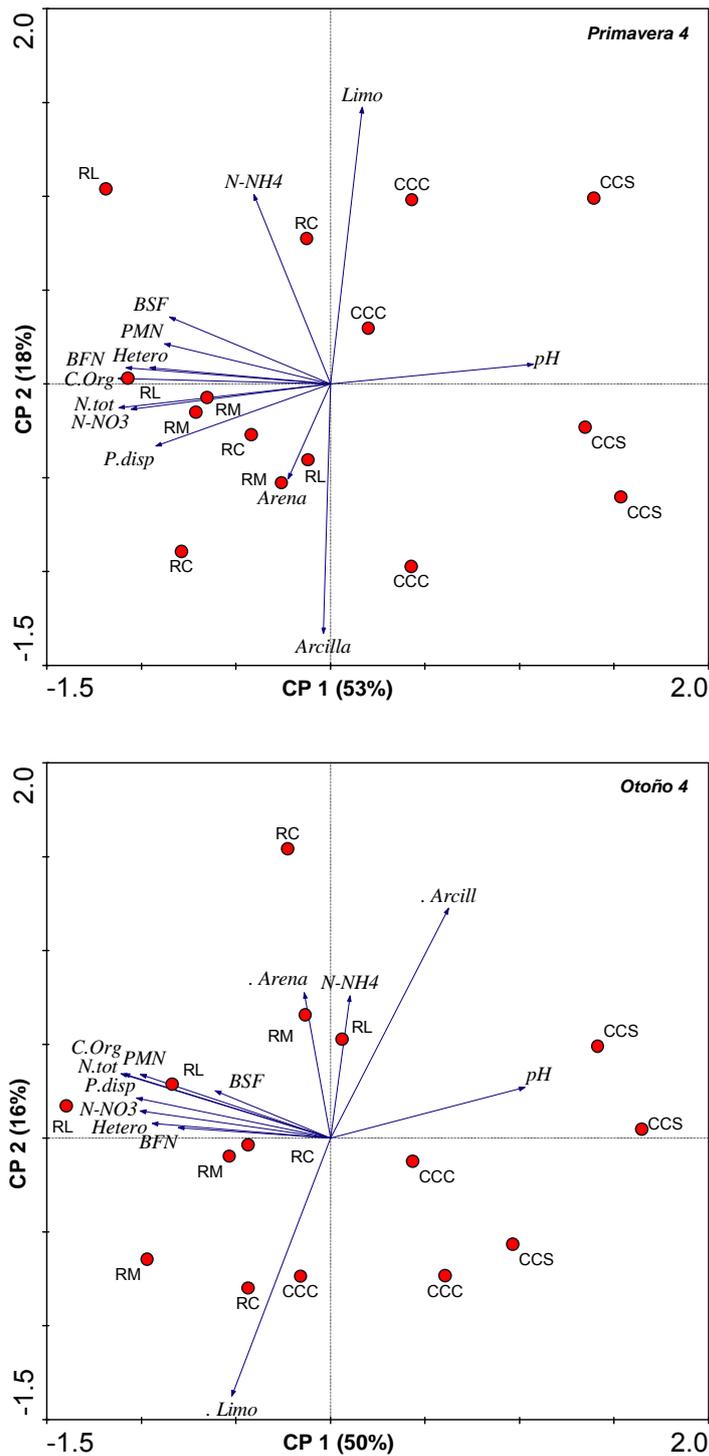


En general, las poblaciones de actinobacterias, *Pseudomonas* fluorescentes, bacterias fijadoras de nitrógeno y heterótrofas se asociaron a las rotaciones, salvo en la primavera 2 donde fueron mayores en los tratamientos con cultivo continuo. A éstos estuvo asociada la población de *Bacillus* spp. en todas las estaciones donde se estudió este grupo.

La abundancia de nutrientes (COrg, N y K) fue en general mayor en alguno de los tratamientos de rotaciones que bajo cultivo continuo, con excepción de la primavera 2. En todas las estaciones de muestreo el pH fue mayor en suelos con cultivo continuo sin fertilizantes respecto a los otros tratamientos.



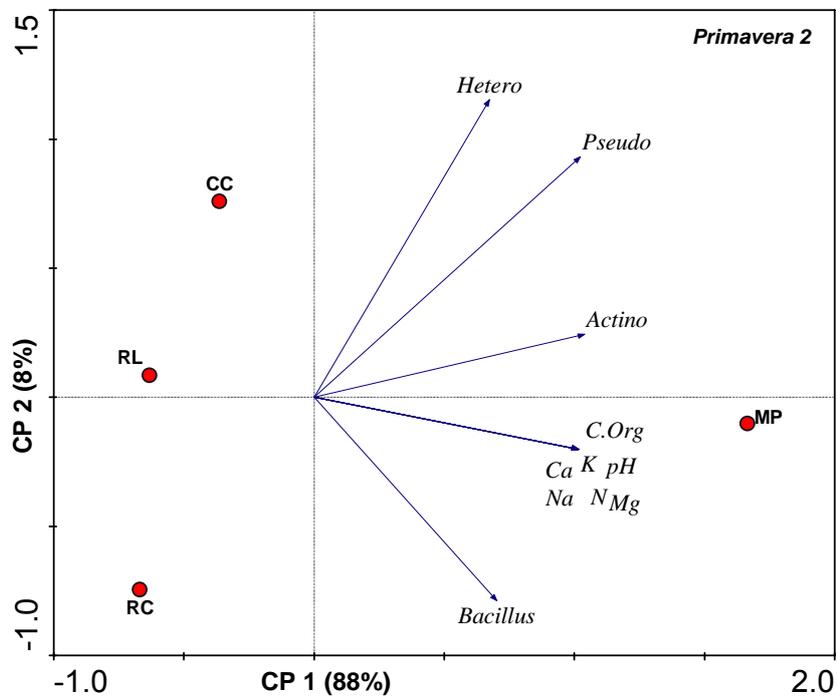
**Figura 30. Análisis de componentes principales para las variables microbiológicas y químicas del suelo en el ensayo de INIA - La Estanzuela, en primavera 2 (arriba) y otoño 2 (abajo). Variables (flechas) - pH; C.Org: carbono orgánico; N: nitrógeno total; contenido de bases: Ca, Mg, K y Na; abundancia de actinobacterias (Actino), *Pseudomonas* fluorescentes (Pseudo) o *Bacillus* spp. (Bacillus) o bacterias heterótrofas (Hetero). Muestras (puntos) - CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RC: rotación corta; RM: rotación media; RL: rotación larga.**



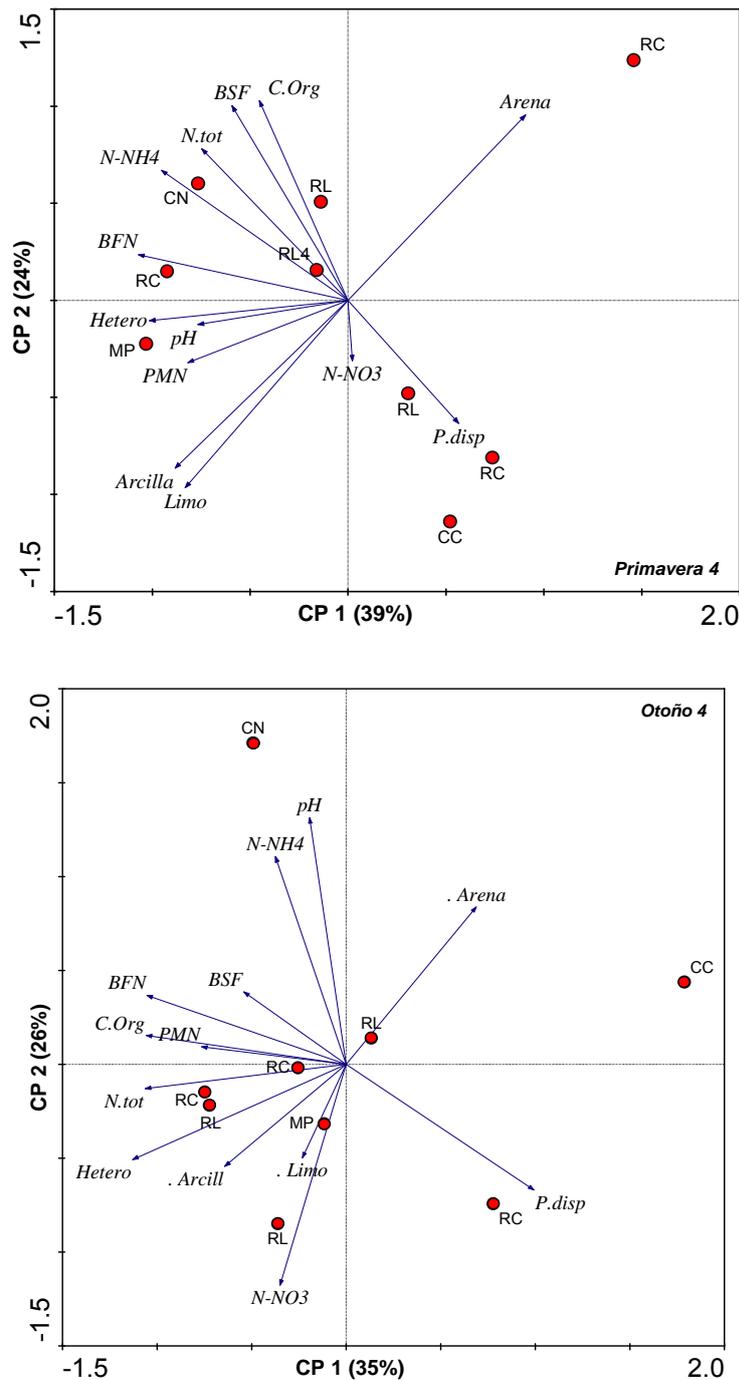
**Figura 31. Análisis de componentes principales para las variables microbiológicas, físicas y químicas del suelo en el ensayo de INIA - La Estanzuela en primavera 4 (arriba) y otoño 4 (abajo). Variables (flechas) - C.Org: carbono orgánico; N.tot: nitrógeno total; N-NO<sub>3</sub>: nitratos; N-NH<sub>4</sub>: amonio; P.disp.: fósforo disponible; PMN: potencial de mineralización de nitrógeno; arena, arcilla, limo: cantidades en %; Hetero: bacterias heterótrofas; BFN: bacterias fijadoras de nitrógeno; BSF: bacterias solubilizadoras de fósforo. Muestras (puntos) - CCS: cultivo continuo sin fertilizantes; CCC: cultivo continuo con fertilizantes; RC: rotación corta; RM: rotación media; RL: rotación larga.**



En el ensayo de Treinta y Tres, en las 4 estaciones donde pudieron realizarse análisis de todos los tratamientos, el primer eje separó el cultivo continuo del mejoramiento permanente y el campo natural. Las rotaciones, tanto corta como larga, se ubicaron a ambos lados del eje principal, debido probablemente a la asincronicidad de las réplicas (figuras 32-34). En general, la abundancia de bacterias y los nutrientes se asociaron al tratamiento de mejoramiento permanente, el pH al campo natural, y el fósforo disponible al sistema de cultivo continuo.



**Figura 33. Análisis de componentes principales para las variables microbiológicas y químicas del suelo en el ensayo de INIA - Treinta y Tres, en primavera 2. Variables (flechas) - pH; C.Org: carbono orgánico; N: nitrógeno total; contenido de bases: Ca, Mg, K y Na; abundancia de actinobacterias (Actino), *Pseudomonas* fluorescentes (Pseudo) o *Bacillus* spp. (Bacillus). Muestras (puntos) - CC: cultivo continuo; RC: rotación corta; RL: rotación larga; MP: mejoramiento permanente.**



**Figura 34.** Análisis de componentes principales para las variables microbiológicas, físicas y químicas del suelo en el ensayo de INIA - Treinta y Tres en primavera 4 (arriba) y otoño 4 (abajo). **Variables (flechas):** C.Org: carbono orgánico; N.tot: nitrógeno total; N-NO<sub>3</sub>: nitratos; N-NH<sub>4</sub>: amonio; P.disp.: fósforo disponible; PMN: potencial de mineralización de nitrógeno; arena, arcilla, limo: cantidades en %; BHT: bacterias heterótrofas totales; BFN: bacterias fijadoras de nitrógeno; BSF: bacterias solubilizadoras de fósforo. **Muestras (puntos):** Mejoramiento permanente (MP): pradera artificial; Rotación larga (RL): 2 años de cultivos forrajeros y 4 años de pradera artificial; Rotación corta (RC): 2 años de cultivos forrajeros y 2 años de pradera artificial; Cultivo continuo (CC): cultivos forrajeros; Campo natural (CN): campo natural sin fertilización.

## 6 DISCUSIÓN

### ***6.1 Efecto de las rotaciones de cultivos sobre la abundancia bacteriana***

Los resultados de esta tesis mostraron, en ambos ensayos, que la introducción de pasturas en rotación con cultivos de grano puede promover un aumento en las poblaciones bacterianas en comparación con el monocultivo. En el ensayo de INIA - La Estanzuela el aumento de las poblaciones bacterianas debido a la introducción de pasturas fue igual o mayor que por fertilización química, indicando que el aumento en la disponibilidad de nutrientes podría explicar los cambios observados. En INIA - Treinta y Tres la abundancia bacteriana en las rotaciones con pasturas fue mayor o similar que en cultivo continuo de granos (donde se aplica fertilización química). Las mayores poblaciones se hallaron en el mejoramiento permanente y fueron similares a las de campo natural.

En ambos ensayos se determinó previamente que las pasturas aumentan la materia orgánica y nutrientes del suelo, y disminuyen su densidad (Terra & García Préchac 2001; Morón & Díaz 2003). En otros estudios se ha observado que los sistemas de pradera y el agregado de materia orgánica tienden a aumentar la biomasa microbiana (Larkin 2003). Se observaron impactos positivos del agregado de fertilizantes sobre la biomasa microbiana, dependientes del cultivo vegetal (mayores en canola que en cebada), y con un efecto acumulativo en el tiempo o independiente del mismo (Dermiyati et al. 2011; Lupwayi et al. 2010). El efecto puede ser dependiente también de la dosis de aplicación, y tener efectos no deseados. A dosis recomendadas agrónomicamente el fertilizante nitrogenado no afectó o aumentó la biomasa microbiana, sin embargo a mayores dosis redujo la

misma (Dermiyati et al. 2011; Lupwayi et al. 2012). Las bacterias fijadoras de nitrógeno podrían ser especialmente sensibles al agregado de fertilizantes nitrogenados. En el trabajo de Orr et al. (2012) se detectó un pequeño impacto de la fertilización sobre la comunidad bacteriana total y la diazotrófica, pero un efecto mayor de las medidas de protección de cultivos, sugiriendo que los diazótrofos (estimados por el número de copias del gen *nifH*) pueden ser especialmente sensibles a los pesticidas.

El origen de la materia orgánica y de los nutrientes aportados al sistema pueden tener diferentes efectos sobre las comunidades microbianas, con resultados contrastantes si se aplican fertilizantes químicos, orgánicos o a través de la incorporación de rotaciones u otras prácticas de manejo, como han reportado algunos estudios recientes (Bernard et al. 2012). Por ejemplo, los estudios de Ngosong et al. (2010) mostraron que las poblaciones microbianas bajo el mismo tipo de cultivo responden de forma diferente a fertilizantes minerales que a enmiendas orgánicas.

Varios estudios han mostrado que la diversificación de las rotaciones, puede resultar en mayor biomasa microbiana que el cultivo continuo de granos. Las poblaciones de bacterias cultivables en suelo tendieron a ser mayores luego de las rotaciones con cebada, canola, maíz, colza, cebada/raigrás y cebada/trébol que bajo cultivo de papa continuo, siendo mayores en la rotación cebada/trébol y colza que en las otras. Sin embargo, las poblaciones cultivables de hongos disminuyeron en la rotación con canola (Larkin 2003; Larkin 2008; Larkin et al. 2010; Larkin & Honeycutt 2006). A pesar que la historia previa de rotaciones tuvo un efecto sobre las poblaciones microbianas de un suelo cultivado con papa, sólo el tratamiento de

fumigación química redujo las poblaciones del patógeno *Verticillium* spp. y aumentó la actividad microbiana general (Larkin, Honeycutt & Olanya 2011).

En un estudio donde se compararon varias prácticas agrícolas, la rotación con colza y el agregado de compost fueron las que tuvieron el mayor impacto sobre las comunidades microbianas del suelo, aumentando las poblaciones de bacterias cultivables (Bernard et al. 2012). Los sistemas de rotaciones de arroz con maíz y poroto mung alcanzaron poblaciones bacterianas en suelo mayores que el monocultivo, así como 24-46% más rendimiento del cultivo de arroz (Xuan et al. 2011). Las rotaciones también fueron beneficiosas para el cultivo de tomate, aumentando 26% su rendimiento que se correlacionó positivamente con la población microbiana total, el C orgánico y N total, sugiriendo que la rotación provocaría cambios en las propiedades microbianas de la rizósfera de la planta que favorecerían su rendimiento (Tian et al. 2009).

En esta tesis se detectó un aumento de las poblaciones de actinobacterias con la presencia de pasturas en la rotación, siendo la población más sensible al tratamiento (intensidad de uso). Diferentes sistemas de cultivo que incluyen rotaciones también tendieron a aumentar la proporción de biomarcadores de FAME de actinobacterias y hongos en comparación al cultivo continuo de papa, siendo la rotación con cebada la que presentó mayor abundancia de estas bacterias (Larkin 2003; Larkin, Honeycutt, Griffin, et al. 2011). En un sistema de rotaciones de 6 años se favoreció la ocurrencia de actinobacterias con fuerte actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* y *Pythium debaryanum* (Gorlach-Lira & Stefaniak 2009). En otros estudios se determinó que la retención de residuos vegetales estimuló las

poblaciones de actinobacterias, mientras que el agregado de compost tuvo el efecto contrario (Govaerts et al. 2008; Bernard et al. 2012).

En este trabajo se observó poca respuesta de las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes al tratamiento agrícola, que fueron bajas en el cultivo continuo sin fertilizantes (INIA - La Estanzuela) y altas en mejoramiento permanente y campo natural (INIA - Treinta y Tres).

En un estudio de diferentes rotaciones de papa, en el sistema con cebada las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes tendieron a ser mayores que con otras especies (Larkin 2003). La rotación de arroz con trigo también tuvo un efecto positivo sobre el número de estas bacterias, indicando que podrían ayudar a controlar enfermedades en el cultivo de trigo (Chen et al. 2010). Sin embargo, en el estudio de Govaerts et al. (2008), tanto la rotación de trigo/maíz como la remoción de restos vegetales presentaron poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes menores que el cultivo continuo de trigo y la retención de residuos, respectivamente. La especie vegetal huésped tiene una gran influencia sobre la dinámica, composición y actividad de las bacterias del género *Pseudomonas* (Bergsma-Vlami et al. 2005). En el suelo total no se observó efecto de las diferentes prácticas agrícolas sobre la abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes, pero sí en suelo rizosférico, donde fue mayor en parcelas sin laboreo y con manejo conservacionista (Agaras et al. 2012).

En particular, las *Pseudomonas* fluorescentes productoras del antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) se vieron enriquecidas en la rizósfera de lino y trigo crecidos en monocultivo, pero no en las rotaciones, sugiriendo que luego de muchos años de monocultivo la especie vegetal se enriquece a partir del suelo de

productores de 2,4-DAPG especialmente adaptados a colonizar su rizósfera (Landa et al. 2006; Svercel et al. 2009). En otro estudio se determinó también que el manejo agrícola puede alterar la abundancia relativa de *Pseudomonas* fluorescentes rizosféricas productoras de 2,4-DAPG, y que las prácticas que reducen las enfermedades de raíz (rotación de cultivos, laboreo y tratamientos químicos de semillas) no siempre se relacionan a un aumento de la colonización radicular por estas bacterias. El efecto de la interacción entre la rotación y el laboreo fue complejo, ya que la secuencia maíz-soja disminuyó la población de productores de DAPG y la secuencia avena-heno la aumentó, pero sometidas a laboreo los resultados fueron totalmente inversos (Rotenberg et al. 2007).

En esta tesis se observó un aumento de la abundancia de las poblaciones diazotróficas de vida libre con el agregado de fertilizantes químicos y con las rotaciones, en el ensayo de INIA - La Estanzuela. En el ensayo de INIA - Treinta y Tres, la tendencia observada fue una mayor abundancia de estas bacterias en el mejoramiento permanente, y poblaciones menores en campo natural. Estos efectos podrían deberse a la mayor presencia de nutrientes y/o a la inoculación de las pasturas.

En un trabajo realizado en un amplio rango de suelos en Australia se encontró que el C en el suelo está estrechamente ligado a la ecología de las bacterias diazotróficas. Principalmente, la cantidad de C que entra al suelo está directamente relacionada a la abundancia y a la actividad de las bacterias fijadoras de N (BFN) en vida libre (Wakelin et al. 2010).

Las especies vegetales presentes pueden tener también un importante efecto sobre las BFN, como se evidenció en un ensayo de cultivos mixtos; en una de las combinaciones de los 2 tréboles evaluados fue donde se observó la mayor actividad nitrogenasa de las BFN en vida libre (Zarea et al. 2009).

En otros estudios se determinó que la rotación de cultivos convencional (papa-cebada) fue el tratamiento que presentó mayor actividad *nifH* comparada con la rotación orgánica (papa-poroto) y los tratamientos químicos. Estos últimos fueron los que presentaron menor cantidad de diazótrofos, indicando que estas bacterias podrían ser especialmente sensibles a los pesticidas (Orr et al. 2011; Orr et al. 2012). Esta comunidad también se vio afectada por el encalado y por el incremento en la carga animal de pastoreo, que aumentaron la capacidad de fijar nitrógeno en praderas. El efecto del pastoreo está relacionado con un aumento en el crecimiento de la pastura y de su contenido en trébol, resultando en una mayor productividad animal. Estos fenómenos indican un incremento en la fijación de N y a largo plazo resultan en una mayor disponibilidad de N y C en el suelo (Wakelin et al. 2009).

En estos mismos ensayos de rotaciones de INIA se analizó previamente la abundancia de otros organismos del suelo: bacterias benéficas, hongos patógenos y macrofauna. En el ensayo de INIA - La Estanzuela, tanto la fertilización química como las rotaciones aumentaron las poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) respecto al cultivo continuo sin fertilizantes. En INIA - Treinta y Tres, las poblaciones de BSF fueron mayores en MP y CN, menores en CC e intermedias en las rotaciones (Azziz et al. 2012). En INIA - La Estanzuela, la población de *Fusarium oxysporum* resultó proporcional al tiempo en que el suelo está bajo pasturas (Altier 2003). También se determinó que el manejo agrícola tuvo un efecto

significativo sobre la de la macrofauna del suelo, ya que el número de individuos de dicha comunidad varió de acuerdo a la intensidad del uso del suelo. En el ensayo de INIA - La Estanzuela, los tratamientos de cultivo continuo sin fertilizante y la rotación larga tuvieron las menores y mayores densidades poblacionales de la mayoría de los taxones, respectivamente (Zerbino 2010). En el ensayo de INIA - Treinta y Tres se registraron las mayores y menores densidades de algunos grupos en MP y CC, e intermedias en las rotaciones (Zerbino 2012).

## ***6.2 Efecto de las rotaciones de cultivos sobre la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas.***

En esta tesis se observó diferente estructura de la comunidad del dominio *Bacteria* de acuerdo a los tratamientos agrícolas, mediante el análisis por DGGE. En el ensayo de INIA - La Estanzuela, la comunidad encontrada en las rotaciones fue diferente a la presente en los tratamientos de cultivo continuo; también se observó un impacto de la fertilización química. En INIA - Treinta y Tres, claramente se diferenciaron las comunidades de campo natural y mejoramiento permanente de la presente bajo cultivo continuo. La estructura de la comunidad en la rotación resultó más similar a la de cultivo continuo en otoño, pero más variable en el muestreo de primavera, probablemente indicando que las réplicas se encuentran en diferentes fases de la rotación. Además de la intensidad del uso del suelo en sí, el cultivo vegetal presente en el momento de muestreo puede tener influencia sobre los microorganismos del suelo a través de la composición de sus exudados y residuos.

Garbeva et al. (2008) evaluaron diferentes historias de uso del suelo (rotación de cultivos bajo laboreo, monocultivo de maíz y pasturas permanentes) y determinaron que tanto la historia de uso como la especie vegetal mostraban claros efectos sobre la comunidad y su diversidad, analizada por PCR-DGGE. Un importante efecto del sistema de cultivo sobre la estructura de la comunidad se observó por DGGE en un estudio realizado en África, donde todos los cereales en monocultivo presentaron comunidades muy similares en todas las especies (maíz, mijo, sorgo) y sitios, mientras que en las rotaciones (con poroto caupí y maní) presentaron mayor variabilidad y relación con la especie vegetal (Alvey et al. 2003). En un estudio de rotaciones de papa-trigo, también se observó un efecto a largo plazo de la rotación, de la estación de muestreo y de la posición en el terreno sobre la comunidad del dominio *Bacteria* y de los ascomycetes, evaluado por PCR-DGGE (Viebahn et al. 2005; Viebahn et al. 2006). En rotaciones de arroz, la composición de las comunidades bacterianas del suelo también fue diferente en comparación con el monocultivo, con mayor diversidad y abundancia, sugiriendo que esta práctica sería apropiada para mantener el equilibrio del ambiente microbiano del suelo y permitiría un cultivo de arroz más sustentable (Xuan et al. 2011).

En algunos trabajos se ha visto que los sistemas de rotaciones y cultivos mixtos aumentan la diversidad bacteriana en la rizósfera de pepino y la población microbiana en tomate, lo que se correlaciona con un mayor rendimiento del cultivo (Tian et al. 2009; Wu et al. 2011; Li et al. 2009). Los efectos de otras rotaciones de cultivos sobre la composición de las comunidades microbianas también fueron detectados en cultivos de papa y colza analizando los perfiles de FAME y los perfiles de utilización de sustrato (Larkin, Honeycutt & Olanya 2011; Bernard et al. 2012;

Larkin 2003; Larkin 2008; Larkin, Honeycutt, Griffin, et al. 2011). La utilización de ciertos carbohidratos, ácidos carboxílicos y aminoácidos se asoció a la rotación con determinados cultivos, indicando diferencias en los atributos funcionales de las comunidades microbianas entre los distintos sistemas (Larkin & Honeycutt 2006). Este efecto de la rotación de cultivos sobre la composición de las comunidades microbianas indica la importancia de las características de los cultivos en dar forma a las comunidades del suelo, y de su potencial en el desarrollo de actividades promotoras del crecimiento de vegetal como la supresividad para patógenos (Larkin 2008).

Los resultados de esta tesis mostraron que los tratamientos de rotaciones presentaron valores de diversidad bacteriana (a partir de los datos de DGGE) similares al cultivo continuo, aunque en el ensayo de INIA - Treinta y Tres presentaron mayores valores de equitatividad. En un ensayo donde se comparó la diversidad microbiana bajo diferentes prácticas de manejo, las diferencias en diversidad observadas fueron atribuidas a efectos sobre la equitatividad y no sobre la riqueza de los amplicones del gen del ARNr 16S (Wu et al. 2008). En el ensayo de INIA - La Estanzuela, el sistema de cultivo continuo sin fertilizantes fue el más diverso. En el ensayo de INIA - Treinta y Tres, la rotación corta presentó mayores índices de diversidad que el cultivo continuo en otoño pero menor en primavera; siendo ambos tratamientos menos diversos que el mejoramiento permanente y el campo natural. En este último ensayo, también se había reportado una mayor diversidad de bacterias solubilizadoras de fosfato en el mejoramiento permanente que bajo cultivo continuo, aunque estadísticamente significativa sólo en uno de los dos años estudiados (Azziz et al. 2012).

Algunos antecedentes muestran que los sistemas de pradera con el agregado de materia orgánica tienden a aumentar la diversidad microbiana del suelo. En el estudio de Larkin (2003) la misma fue mayor bajo trigo precedido de leguminosas (trébol rojo o arveja de campo) que bajo trigo continuo. La fertilización ya sea sintética o por enmiendas orgánicas también puede producir cambios en la diversidad microbiana, como se reportó en la diversidad funcional asociada a cultivos de canola y cebada (estimada por el perfil fisiológico) y la diversidad estructural en cultivo de tomate (estimada por DGGE y el cálculo de índices) (Lupwayi et al. 2010; Liu et al. 2007). La fertilización química fosfatada produjo un cambio en la estructura de las comunidades de bacterias y hongos determinada por DGGE y TRFLP en suelo de pradera, al igual que el aumento de la carga animal (Wakelin et al. 2009).

Las rotaciones de cultivos pueden promover la diversidad microbiana del suelo, debido a la mayor diversidad vegetal presente. Sin embargo, en un ensayo realizado al sur de Brasil, se describió por secuenciación masiva una mayor diversidad microbiana en cultivos sólo con cereales (avena y maíz) en relación a las rotaciones con leguminosas (vicia y poroto caupí) (Dorr de Quadros et al. 2012). Por el contrario, otros estudios sí demuestran que los sistemas de rotaciones presentan mayor diversidad, como en el caso del trigo seguido de trébol rojo, arveja o abono verde, del cultivo de tomate en rotación con trigo y con trébol rojo (pero no con alfalfa) y de rotaciones del cultivo de papa (Lupwayi et al. 1998; Li et al. 2009; Larkin, Honeycutt, Griffin, et al. 2011). A escala regional, en la Pampa Argentina, se determinó que los sistemas de rotaciones presentaron una diversidad equivalente a la de las praderas naturales, y mayor que el monocultivo de soja que conlleva a una

homogeneización de las comunidades bacterianas (Figuerola et al. 2014). En otros casos, el beneficio de las rotaciones para la diversidad depende de las especies vegetales incluidas. Los índices de diversidad y equitatividad de la rotación de pepino con poroto y apio fueron mayores que con otros cultivos, al igual que su rendimiento, los cuales estuvieron positivamente correlacionados (Wu et al. 2011). En otro caso, la diversidad y riqueza en la utilización de sustratos fue mayor en rotaciones de papa con cebada, canola y maíz, que con soja, indicando diferencias en los atributos funcionales de las comunidades microbianas y su interacción con la planta (Larkin 2003; Larkin & Honeycutt 2006). Estos trabajos indican que las rotaciones de cultivos, principalmente las basadas en leguminosas, pueden albergar una mayor diversidad de las comunidades microbianas del suelo, aumentando la sustentabilidad de los ecosistemas agrícolas.

En esta tesis, el análisis de grupos específicos de bacterias mostró que la relación de estas comunidades con el tratamiento agrícola no fue tan evidente, con excepción de la comunidad diazotrófica que se diferenció en el cultivo continuo sin fertilizantes del resto de los sistemas en el ensayo de INIA - La Estanzuela. Se observó que la fertilización química y orgánica a largo plazo produjo un aumento en la diversidad de las bacterias fijadoras de nitrógeno, estimada como filotipos del gen *nifH* (Tang et al. 2012). El efecto de las prácticas de manejo sobre la estructura de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno presente en suelos agrícolas de Australia (analizada por DGGE del gen *nifH*) fue significativo y en muchos casos mayor que el efecto de diferentes tipos de suelo (Wakelin et al. 2010).

En un trabajo anterior se detectó que la población de *Pseudomonas* fluorescentes en el rizoplano de papa es muy homogénea, y no se vio afectada por el sistema de

manejo ni la rotación de cultivos (Ferreira et al. 2009). Por el contrario, se determinó por PCR-DGGE con cebadores específicos de grupo que las comunidades de *Pseudomonas* y *Bacillus* se vieron muy afectadas por la especie vegetal y el tipo de suelo, y que el cultivo en rotación con papa (cebada o poroto) tuvo un efecto significativo en la diversidad de los fijadores de N en vida libre (Garbeva et al. 2008; Orr et al. 2011).

### **6.3 Efecto de los tratamientos agrícolas sobre otras propiedades del suelo**

Los sistemas de manejo afectan significativamente las enfermedades que tienen origen en el suelo, las comunidades microbianas y el rendimiento del cultivo, pero también afectan varias otras propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Los efectos acumulativos de años de rotaciones, al igual que otros aspectos de las prácticas de producción como el uso de fertilizantes, herbicidas, cultivos de cobertura, laboreo, etc. resultan en grandes diferencias en las propiedades químicas del suelo (Larkin 2003; Larkin 2008).

En esta tesis se observó que las rotaciones presentan propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo diferentes a los sistemas de cultivo continuo. En el ensayo de INIA - La Estanzuela las primeras se asociaron principalmente a las variables microbiológicas y al contenido de nutrientes en el suelo, mientras que el cultivo continuo sin fertilizantes presentó mayores valores de pH. En INIA - Treinta y Tres el cultivo continuo se diferenció del mejoramiento permanente y campo natural, mientras que el resultado en las rotaciones dependió de la estación de muestreo y la

fase en que se encontraban las mismas. El CC se encontró asociado al P disponible, el MP a los nutrientes y abundancia de bacterias y el CN al pH.

En los estudios de macrofauna realizados anteriormente en el ensayo de INIA - La Estanzuela, el análisis de co-inercia entre las propiedades edáficas y la densidad de organismos fue significativo. El primer eje ordenó los usos del suelo de acuerdo a su intensidad, y algunos taxones estuvieron asociados a la rotación larga, sistema con mayor cantidad de carbono orgánico y nitrógeno total. En el ensayo de INIA - Treinta y Tres, la composición específica de las comunidades de oligoquetos, así como la relación adultos/inmaduros y el número de capullos reflejaron el impacto que producen distintas intensidades de uso del suelo en siembra directa con pastoreo sobre el contenido de carbono orgánico y la densidad aparente del suelo. Se concluyó que la evaluación de la macrofauna del suelo conjuntamente con otras propiedades del mismo es una herramienta útil para evaluar su sustentabilidad (Zerbino 2010; Zerbino 2012). Además, se pueden incluir parámetros microbianos que son más dinámicos y presentan una respuesta a los cambios más rápida que los fisicoquímicos.

En el estudio de Wakelin et al. (2008) el tipo de suelo fue el determinante clave de la estructura de las comunidades microbianas y de sus funciones catabólicas, más que la práctica de manejo agrícola. El pH es una variable que en general tiene gran influencia en las comunidades microbianas del suelo. Por análisis multivariados se identificó el pH del suelo como la propiedad fisicoquímica clave en la selección de hábitat, asociada a variaciones en la diversidad (DGGE) y utilización de sustratos (MicroResp<sup>TM</sup>). Al disminuir el pH, el catabolismo de algunos compuestos orgánicos de bajo peso molecular por parte de la microbiota disminuía y el de otros

aumentaba, con implicancias sobre los ciclos geoquímicos del C y N. La estructura de las comunidades bacterianas se correlacionó con el pH, y la de los hongos con el pH y el % de arena. En este contexto, es que las prácticas agrícolas actúan modulando selectivamente las poblaciones y funciones microbianas.

En otro trabajo, la estructura de la comunidad cambió significativamente a lo largo de gradientes de pH y saturación de bases, explicando los atributos del suelo el 31% de la variabilidad observada (Jesus et al. 2009). Además, el pH del suelo se correlacionó negativamente con la abundancia de *Pseudomonas* fluorescentes conteniendo el gen *phlD*, responsable de la síntesis del antibiótico 2,4-DAPG (Rotenberg et al. 2007).

En otro estudio, el tipo de suelo fue el factor principal que influyó en las comunidades fijadoras de nitrógeno, siendo las características del suelo tales como contenido en amonio, pH y textura las que se correlacionaron más fuertemente con variaciones en la diversidad, tamaño y estructura de las comunidades diazotróficas. Éstas fueron más abundantes y diversas en los suelos arcillosos que en los arenosos, además de ser más variables en cuanto a su tamaño y riqueza, sugiriendo que en estos tipos de suelo pueden ser más sensibles a fluctuaciones asociadas a la estación y a las prácticas agrícolas (Pereira e Silva et al. 2011).

En suelos cultivados, tanto con rotaciones como en monocultivo, se detectaron menores niveles de carbono orgánico, nitrógeno total y actividades enzimáticas microbianas respecto al suelo natural no perturbado, pero los sitios con monocultivo presentaron la menor actividad (González et al. 2007).

En esta tesis no se hacen comparaciones entre los ensayos, ya que las diferencias geográficas entre los sitios donde están ubicados son muy importantes y seguramente con gran peso sobre las propiedades del suelo, incluidas las microbianas. En un estudio anterior se determinó que el mismo tratamiento agrícola puede tener diferentes efectos en dos sitios distintos, reflejando las grandes diferencias basales en las comunidades microbianas, que pueden estar relacionadas a las diferentes historias de manejo y características del suelo entre los sitios (Bernard et al. 2012).

Se determinó previamente en los ensayos de INIA analizados en esta tesis, que las rotaciones cultivo - pasturas presentan menor densidad aparente, y mayor contenido de materia orgánica y C orgánico, recuperando la estructura de suelo y controlando la erosión, lo que resulta en una mayor producción de pasturas, cultivos y carne, y mejores rendimientos económicos (Morón & Díaz 2003; Terra & García Préchac 2001).

#### ***6.4 Efecto de diferentes prácticas agrícolas sobre las comunidades microbianas del suelo***

Algunos estudios han sugerido un efecto duradero de la historia de cultivo sobre la comunidad microbiana del suelo, que sería un determinante más fuerte de su composición que la vegetación y las propiedades del suelo (Jangid et al. 2011).

Cuando se combinan varias prácticas agrícolas sus efectos sobre las comunidades microbianas del suelo pueden ser aditivos (Larkin 2003). En un estudio, tanto las

rotaciones como el agregado de fertilizantes afectaron significativamente a las comunidades microbianas, pero los efectos de las rotaciones fueron más dominantes (Bernard et al. 2012).

Las prácticas de manejo que alteran las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo pueden afectar consecuentemente los procesos microbianos en la rizósfera. Cambios físicos en la estructura del suelo luego del laboreo, y el agregado de compost, redujeron la diversidad bacteriana en mayor medida en el suelo bruto que en la rizósfera (Lupwayi et al. 1998; Inbar et al. 2005). Por el contrario, la rotación de cultivos aumentó la diversidad en la rizósfera, probablemente debido a las especies vegetales que alteran a las rizobacterias presentes y pueden estimular diferentes grupos de forma diferencial (Buée et al. 2009).

Un experimento de larga duración (20 años) se llevó a cabo en Italia para investigar el efecto de diferentes prácticas de manejo de residuos y sistemas de rotaciones sobre las propiedades del suelo. Todos los parámetros químicos, microbiológicos y bioquímicos evaluados mostraron diferencias significativas de acuerdo al manejo de residuos, pero pocos efectos se observaron con los tratamientos de rotaciones y fertilización nitrogenada. Se encontraron correlaciones significativas que indicaron la importancia del rol del contenido en C orgánico en determinar el nivel de actividad enzimática del suelo y en consecuencia su fertilidad (Perucci et al. 1997).

Las rotaciones del cultivo de papa con cultivos de grano resultaron en mayor ingreso de materia orgánica en el suelo así como de C y N a partir de los residuos vegetales, con efectos sobre las comunidades microbianas que son diferentes si se utiliza trébol o raigrás en la rotación; la cantidad de C puede ser un factor más importante que el

ingreso de N en cuanto a sus efectos sobre las comunidades (Larkin & Honeycutt 2006; Larkin 2008).

Resultados previos de ensayos de larga duración recomiendan la combinación del no laboreo con un correcto manejo de los residuos y de la secuencia de cultivos para conservar la diversidad de las comunidades bacterianas del suelo (Ceja-Navarro et al. 2010). En otros estudios se sugiere que la implementación de buenas prácticas agrícolas, que incluyen la rotación de cultivos, puede ser crítica para la conservación a largo plazo de la biodiversidad del suelo y de sus funciones (Figuerola et al. 2014).

### ***6.5 Efecto de la especie vegetal sobre las comunidades bacterianas***

Diferentes especies vegetales y en algunos casos diferentes cultivares pueden influenciar las comunidades microbianas (Garbeva et al. 2004). En algunos estudios, los efectos de la planta sobre los microorganismos del suelo son considerados secundarios a otros factores como el tipo de suelo. Sin embargo, algunas veces estos estudios resultan muy artificiales, cuando se comparan tipos de suelo extremadamente diferentes. Es difícil hacer una generalización, y probablemente el factor dominante con mayor influencia en la microbiota del suelo dependa de cada situación específica. El tipo de suelo puede ser más crítico cuando se comparan tipos de suelo muy divergentes mientras que cuando los suelos son más similares entre muestras, los efectos de las plantas son más importantes. Varios estudios han documentado el rol y la importancia de las especies vegetales en determinar la

composición de las comunidades microbianas del suelo (Grayston et al. 1998; Wieland et al. 2001). Los efectos de las plantas sobre las comunidades microbianas del suelo, así como diferencias entre especies vegetales, serían resultado de la liberación de nutrientes y compuestos orgánicos a través de las raíces y de la degradación de la materia orgánica vegetal (Larkin 2008).

Se ha visto que las características de la comunidad microbiana pueden cambiar drásticamente luego de un ciclo de cultivo, basadas únicamente en la especie vegetal presente, indicando la fuerte influencia que tienen diferentes especies de plantas sobre los microorganismos, actividad y procesos del suelo (Larkin 2008). En un estudio de praderas en Australia, el aumento de la riqueza de los filotipos de hongos estuvo relacionado directamente con una reducción en la diversidad vegetal (Wakelin et al. 2009).

Los efectos estacionales sobre las poblaciones rizosféricas bacterianas y fúngicas en diferentes cultivos también pueden depender de la especie vegetal y de su estado de maduración, demostrando que diferentes plantas seleccionan y definen sus propias comunidades rizosféricas funcionales que cambian en respuesta al crecimiento de la planta (Houlden et al. 2008).

## ***6.6 Efecto de la estación de muestreo sobre las comunidades microbianas del suelo***

En esta tesis, los efectos causados por los tratamientos agrícolas no fueron siempre equivalentes en las diferentes estaciones de muestreo analizadas, por lo que es

importante considerar la influencia de las variaciones estacionales sobre la composición de las comunidades (Ahemad et al. 2009). En el estudio de bacterias solubilizadoras de P realizado en el ensayo de INIA - Treinta y Tres, se encontraron diferencias en su abundancia y diversidad en el primer año pero no en el segundo año de muestreo (Azziz et al. 2012). En los estudios de macrofauna en el mismo sitio, los muestreos se llevaron a cabo en los meses de setiembre (primavera) y abril (otoño), épocas de mayor abundancia de la fauna del suelo (Zerbino 2010).

En un campo de trigo en Holanda se estudió el impacto de la variación estacional sobre las comunidades microbianas durante un año, usando métodos dependientes e independientes de cultivo, y se determinó que en uno de los meses (julio) la comunidad presentaba las mayores diferencias con los otros meses (Smit et al. 2001). En otro estudio realizado durante 3 años en el noreste de Inglaterra, los impactos del manejo de cultivo sobre las comunidades de bacterias totales y diazotróficas fueron mucho menores que la influencia temporal. Los determinantes principales de los cambios cuali- y cuantitativos de las comunidades fueron los efectos anuales y estacionales, y sus actividades fueron afectadas significativamente por la temperatura del suelo y las condiciones climáticas (Orr et al. 2012).

El efecto de las rotaciones sobre la riqueza, diversidad y actividad de las comunidades microbianas puede depender de la estación de muestreo. Por ejemplo, en sistemas de producción de papa, la inclusión de colza en la rotación disminuyó la actividad microbiana en las muestras de primavera pero la aumentó en las muestras de otoño comparada con la rotación estándar en uno de los sitios, mientras que lo contrario ocurrió en el otro sitio estudiado, y no se observó efecto en las muestras de verano (Bernard et al. 2012).

Varios estudios han investigado la variabilidad espacial de las comunidades microbianas, pero la variabilidad temporal ha recibido menos atención. En un trabajo donde se investigó mensualmente la comunidad bacteriana por secuenciación masiva en 3 tipos de uso del suelo (convencional, rotaciones y pradera) se determinó que cada sitio presentaba una comunidad única y patrones temporales diferentes. La diversidad alfa estuvo muy afectada por el momento de muestreo, con una variabilidad temporal mayor que la variabilidad entre los tipos de uso. Por el contrario, las diferencias en la composición de las comunidades entre sitios fue relativamente constante por 7 meses, sugiriendo que el momento de muestreo no es tan importante cuando se evalúa la diversidad beta. De los 3 sitios, el suelo agrícola fue el más variable con el tiempo, y sus cambios se correlacionaron con la humedad del suelo y la temperatura. En otro trabajo se observaron cambios en la comunidad fúngica de praderas, pero no en la comunidad bacteriana con el momento de muestreo. Dicha variabilidad temporal se correlacionó positivamente con la lluvia. Sin embargo, los cambios temporales en praderas fueron menos predecibles, debido probablemente a las interacciones complejas entre el ambiente del suelo y la comunidad vegetal que es más diversa. Es necesario considerar la variabilidad temporal cuando se compara la diversidad microbiana entre diferentes sitios, ya que los patrones temporales en la estructura de la comunidad no pueden ser generalizados entre diferentes tipos de uso, incluso si los suelos están expuestos a las mismas condiciones climáticas (Wakelin et al. 2009; Lauber et al. 2013).

## **6.7 Variabilidad metodológica en los estudios de las comunidades microbianas del suelo**

Las comunidades microbianas del suelo presentan una gran variabilidad espacial, con una gran heterogeneidad en la diversidad de especies. La extracción de ADN para su estudio se realiza a partir de cantidades relativamente pequeñas de suelo. Estos factores aumentan la variabilidad en las determinaciones de los efectos de los tratamientos en estudios de campo. Sin embargo, si se realizan estrategias de muestreo cuidadosas que minimicen la variabilidad espacial, pueden reducirse a niveles menores que las variaciones inducidas por los tratamientos agrícolas. Por otra parte, evaluar la diversidad y la estructura de la comunidad microbiana por métodos moleculares, presenta dudas respecto a la eficiencia de la extracción de ADN y de los sesgos de la amplificación por PCR. En algunos casos es común encontrar alta variabilidad dentro de los patrones de bandas de la comunidad obtenidos por DGGE del gen del ARNr entre parcelas que representan réplicas de campo. A pesar de estas limitaciones, el PCR y las técnicas de análisis de amplicones (DGGE, TRFLP, secuenciación masiva) siguen siendo ampliamente utilizadas en ecología microbiana y son herramientas útiles y poderosas, pero es esencial asegurar que los sesgos ocurren de forma homogénea en todas las muestras que se comparan (Wakelin et al. 2009; Helgason et al. 2010).

Por otra parte, la validez de utilizar índices de diversidad de ecología de macroorganismos para explorar los atributos de las comunidades microbianas a partir de datos obtenidos con técnicas basadas en PCR ha sido criticada, dado que la abundancia de cada una de las bandas puede no ser proporcional a la abundancia

original del organismo debido a sesgos de las técnicas (Bent et al. 2007). El uso de estos índices es más válido si se aplica para comparar la diversidad entre tratamientos más que para determinar valores absolutos de riqueza, diversidad y equitatividad (Wakelin et al. 2009).

En algunos trabajos, a pesar de observarse mucha variabilidad en las características microbianas del suelo, los resultados obtenidos por diferentes técnicas y entre sistemas de cultivos fueron consistentes en las diferentes estaciones, enfatizando que las tendencias observadas representan diferencias reales relacionadas al tratamiento agrícola, que se espera que se incrementen luego de aplicados repetidas veces en estudios de larga duración (Larkin 2003).

Es valioso realizar análisis comparativos con múltiples aproximaciones técnicas; la caracterización puede no ser adecuada si sólo se utiliza una metodología. Cuando se detectan diferencias en los resultados obtenidos, pueden reflejar los atributos particulares medidos por cada técnica y no necesariamente sugerir que un método u otro es "correcto" (Larkin 2003).

Cuando los parámetros medidos son afectados significativamente por diferentes prácticas de manejo, se sugiere que son variables que podrían representar potenciales indicadores, como es el caso del C orgánico, el N total y las actividades enzimáticas. Un mayor contenido en C orgánico puede mejorar la estabilidad estructural y aumentar la retención de agua, condiciones favorables para la actividad microbiana como se pudo medir por métodos enzimáticos. Estos parámetros bioquímicos permitieron identificar diferencias entre el suelo natural y el cultivado, pero también entre los diferentes sistemas de manejo, representando

indicadores más sensibles que las medidas de C orgánico y N total. Resultados similares fueron reportados anteriormente donde se encontró que los parámetros microbianos responden a cambios en el manejo del suelo en el corto plazo, mientras que la materia orgánica del suelo cambia más a largo plazo (González et al. 2007). Las comunidades microbianas del suelo en general son más rápidas en su respuesta a cambios en las prácticas de cultivo y manejo que los parámetros fisicoquímicos del suelo (Larkin 2003).

## **6.8 Conclusiones y consideraciones finales**

Los principales efectos de las rotaciones de cultivos de grano y pasturas sobre las comunidades bacterianas del suelo fueron: aumento de poblaciones de actinobacterias y fijadores de nitrógeno en vida libre, cambio en la estructura de la comunidad de bacterias fijadoras nitrógeno y del dominio *Bacteria*, así como aumento de su diversidad.

Se confirmó la hipótesis planteada, que la rotación de cultivos de granos con pasturas modifica la estructura de las comunidades de bacterias del suelo con potencial como promotoras del crecimiento vegetal, alterando su abundancia y diversidad.

Los diferentes efectos se observaron con mayor o menor importancia en los dos ensayos de rotaciones analizados. Estos ensayos de larga duración fueron establecidos con prácticas agrícolas comúnmente utilizadas en nuestro país, con el objetivo de evaluar el efecto de sistemas de producción sobre las propiedades

fisicoquímicas del suelo. Debido a su diseño experimental, presentan ciertas limitaciones para alcanzar conclusiones generales en los aspectos microbiológicos.

En otros estudios donde se analizaron diferentes tratamientos agrícolas se vio que cada factor tuvo efectos específicos sobre las comunidades microbianas del suelo y que los efectos combinados tienden a ser complementarios, sugiriendo el potencial de combinar múltiples prácticas de manejo compatibles para mejorar la salud del suelo y de la planta, considerando la historia previa de manejo, ya que diferentes respuestas son observadas frecuentemente en diferentes sitios (Larkin 2003).

Si se comprenden mejor los efectos y las interacciones de las rotaciones de cultivos y otras prácticas de manejo sobre las comunidades microbianas del suelo, se podrán determinar formas prácticas de manipular el ambiente microbiano para mejorar la salud de los cultivos y la productividad reduciendo el uso de insumos químicos. Para eso es necesario identificar los cambios específicos y las características microbianas asociadas a sistemas de cultivo particulares y relacionar estos cambios a los efectos sobre el manejo de enfermedades, salud y productividad, con el objetivo de implementar prácticas de manejo que optimicen el ambiente microbiano para reducir la enfermedad, aumentar la producción y lograr una sustentabilidad a largo plazo (Bernard et al. 2012). Una mejor comprensión de los impactos de las prácticas de manejo sobre por ejemplo los fijadores de nitrógeno en vida libre podría permitir modificaciones en los sistemas agrícolas para optimizar la actividad de estos organismos (Orr et al. 2011).

Se cuenta con poca información sobre cómo los cambios en la estructura de las comunidades y en diferentes grupos taxonómicos se relacionan a las capacidades

funcionales de dichas comunidades. A pesar que es necesario un conocimiento más detallado de las relaciones funcionales entre los microorganismos para determinar los efectos de la diversidad sobre el funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas, es más seguro adoptar prácticas de manejo agrícola que conserven y restablezcan la diversidad funcional que prácticas que la deterioren. La diversidad funcional y redundancia que refiere al conjunto de organismos quiescentes de una comunidad con superposiciones interespecíficas y plasticidad en sus características, son símbolos de una mayor salud del suelo, y permiten que un ecosistema mantenga una función estable y presente mayor resiliencia (Govaerts et al. 2008).

La relación entre las comunidades microbianas del suelo y las prácticas agrícolas es difícil de interpretar en forma global, ya que diversos factores como la heterogeneidad del suelo, la vegetación, variaciones temporales, el período de tiempo desde que fue introducido el cambio, la escala de muestreo y la resolución de las técnicas empleadas también son determinantes. En general, los parámetros fisicoquímicos del suelo parecen ser factores con mayor influencia sobre las comunidades microbianas del suelo que la vegetación o las prácticas agrícolas (Kuramae et al. 2012).

De todas maneras, los cambios antropogénicos sobre los agroecosistemas son inevitables, debido a las perturbaciones impuestas por la propia actividad agrícola. Lo que debe asegurarse es que los procesos microbianos involucrados en la sustentabilidad del sistema no se vean comprometidos con las prácticas aplicadas, ni se produzcan impactos negativos en otros ecosistemas más allá del cual se está modificando.

## 7 REFERENCIAS

- Aboim, M. C. R., Coutinho, H. L. C., Peixoto, R. S., Barbosa, J. C., & Rosado, A. S. (2008). Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-and-burn cultivation system in Southeastern Brazil. *Applied Soil Ecology*, *38*, 100–108.
- Agaras, B., Wall, L. G., & Valverde, C. (2012). Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina. *Applied Soil Ecology*, *61*, 305–319.
- Ahemad, M., Almas, Z., Khan, M. S., & Oves, M. (2009). Factors Affecting the Variation of Microbial Communities in Different Agro-Ecosystems. In M. S. Khan, A. Zaidi, & J. Musarrat (Eds.), *Microbial Strategies for Crop Improvement* (pp. 301–234). Springer.
- Altier, N. (1996). Enfermedades de leguminosas forrajeras: diagnóstico, epidemiología y control. *INIA, Serie Técnica*, *74*, 87–104.
- Altier, N. (2003). Caracterización de la población de *Fusarium oxysporum* y potencial patogénico del suelo bajo rotaciones agrícola ganaderas. In A. Morón & R. Díaz (Eds.), *Simposio: 40 años de rotaciones agrícolas-ganaderas* (pp. 37–44). Montevideo: Editorial Hemisferio Sur.
- Alvey, S., Yang, C.-H., Buerkert, A., & Crowley, D. (2003). Cereal / legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west african soils. *Biology and Fertility of Soils*, *37*, 73–82.
- Andreote, F. D., Rocha, U. N. Da, Araújo, W. L., Azevedo, J. L., & van Overbeek, L. S. (2010). Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek*, *97*, 389–99.
- Azziz, G., Bajsa, N., Haghjou, T., Taulé, C., Valverde, Á., Igual, J. M., & Arias, A. (2012). Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Applied Soil Ecology*, *61*, 320–326.
- Bajsa, N., Morel, M., Braña, V., & Castro-Sowinski, S. (2013). The Effect of Agricultural Practices on Resident Soil Microbial Communities: Focus on Biocontrol and Biofertilization. In F. J. de Bruijn (Ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere. Vol. 2* (Vol. 2, pp. 687–700). Wiley Blackwell.
- Ball, B., Bradford, M., Coleman, D., & Hunter, M. (2009). Linkages between below and aboveground communities: decomposer responses to simulated tree species loss are largely additive. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*, 1155–1163.
- Bardgett, D., Leemans, D., Cook, R., & Hobbs, P. (1997). Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, *29*, 1285–1294.
- Bardgett, R. ., Jones, A. C., Jones, D. L., Kemitt, S. J., Cook, R., & Hobbs, P. J. (2001). Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, *33*, 1653–1664.

- Bent, S. J., Pierson, J. D., & Forney, L. J. (2007). Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*, 2399–2401.
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, *68*, 1–13.
- Bergsma-Vlami, M., Prins, M. E., & Raaijmakers, J. M. (2005). Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, *52*, 59–69.
- Bernard, E., Larkin, R. P., Tavantzis, S., Erich, M. S., Alyokhin, A., & Gross, S. D. (2014). Rapeseed rotation, compost and biocontrol amendments reduce soilborne diseases and increase tuber yield in organic and conventional potato production systems. *Plant and Soil*, *374*, 611–627.
- Bernard, E., Larkin, R. P., Tavantzis, S., Erich, M. S., Alyokhin, A., Sewell, G., ... Gross, S. D. (2012). Compost, rapeseed rotation, and biocontrol agents significantly impact soil microbial communities in organic and conventional potato production systems. *Applied Soil Ecology*, *52*, 29–41.
- Bettucci, L., Rodríguez, C., & Indarte, R. (1993). Fungal communities of two grazing-land soils in Uruguay. *Pedobiologia*, *37*, 72–82.
- Bossio, D. A., Scow, K. M., Gunapala, N., & Graham, K. J. (1998). Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, *36*, 1–12.
- Brussaard, L., de Ruiter, P. C., & Brown, G. G. (2007). Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *121*, 233–244.
- Buckley, D. H., & Schmidt, T. M. (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agroecosystems. *Environmental Microbiology*, *5*, 441–452.
- Buée, M., Boer, W., Martin, F., Overbeek, L., & Jurkevitch, E. (2009). The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil*, *321*, 189–212.
- Bustamante, M., Said-Pillicino, D., Paredes, C., Cecilia, J., & 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.
- Butenschoen, O., Scheu, S., & Eisenhauer, N. (2011). Interactive effects of warming, soil humidity and plant diversity on litter decomposition and microbial activity. *Soil Biology Biochemistry*, *43*, 1902–1907.
- Carrasco, L. (2003). *Evaluación de los cambios estructurales y funcionales de ecosistemas microbianos edáficos provocados por la forestación de praderas uruguayas*. Universidad de Concepción, Chile.

- Ceja-Navarro, J. A., Rivera-Orduña, F. N., Patin, L., Govaerts, B., & Dendooven, L. (2010). Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*, 3685–3691.
- Chen, H.-G., Cao, Q.-G., Xiong, G.-L., Li, W., Zhang, A.-X., Yu, H.-S., & Wang, J.-S. (2010). Composition of wheat rhizosphere antagonistic bacteria and wheat sharp eyespot as affected by rice straw mulching. *Pedosphere*, *20*, 505–514.
- Cleary, D. F. R., Smalla, K., Mendonc, L. C. S., & Gomes, N. C. M. (2012). Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE*, *7*, 1–8.
- Colnaghi, R., Green, A., He, L., Rudnick, P., & Kennedy, C. (1997). Strategies for increased ammonium production in free-living or plant associated nitrogen fixing bacteria. *Plant and Soil*, *194*, 145–154.
- Demba Diallo, M., Willems, A., Vloemans, N., Cousin, S., Vandekerckhove, T. T., De Lajudie, P., ... Van der Gucht, K. (2004). Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environmental Microbiology*, *6*, 400–415.
- Dermiyati, E. F., Utomo, M., Arif, M. A. S., & Nugroho, S. G. (2011). Soil microbial biomass carbon under rhizosphere and non-rhizosphere of maize after a long-term nitrogen fertilization and tillage systems. *Jurnal TANAH TROPIKA (Journal of Tropical Soils)*, *16*, 63–68.
- Díaz, R. (2003). 40 años de rotaciones: Introducción a la actividad experimental. In A. Morón & R. Díaz (Eds.), *Simposio: 40 años de rotaciones agrícolas-ganaderas* (pp. IX – XIII). Montevideo: Editorial Hemisferio Sur.
- Döbereiner, J. (1980). Forage grasses and grain crops. In F. J. Bergerson (Ed.), *Methods for evaluating biological nitrogen fixation* (pp. 535–555). Wiley & Sons, USA.
- Doran, J. W., & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, *15*, 3–11.
- Dorr de Quadros, P., Zhalnina, K., Davis-Richardson, A., Fagen, J. R., Drew, J., Bayer, C., ... Triplett, E. W. (2012). The effect of tillage system and crop rotation on soil microbial diversity and composition in a subtropical acrisol. *Diversity*, *4*, 375–395.
- Drijber, R. A., Doran, J. W., Parkhurst, A. M., & Lyon, D. J. (2000). Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat- fallow management. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*, 1419–1430.
- Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N., & Wagner-Dobler, I. (1999). Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 102–109.

- Ellis, R. J., Morgan, P., Weightman, A. J., & Fry, J. C. (2003). Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 3223–3230.
- Evans, F. F., Seldin, L., Sebastián, G. V., Kjelleberg, S., Holmstrom, C., & Rosado, A. S. (2004). Influence of petroleum contamination and biostimulation treatment on the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based-PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*, *38*, 93–98.
- Fernández Scavino, A., Menes, J., Ferrando, L., & Tarlera, S. (2010). Bacterial community analysis of the water surface layer from a rice-planted and an unplanted flooded field. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*, 411–419.
- Ferreira, E. P. D. B., Dusi, A. N., Costa, J. R., Xavier, G. R., & Rumjanek, N. G. (2009). Assessing insecticide and fungicide effects on the culturable soil bacterial community by analyses of variance of their DGGE fingerprinting data. *European Journal of Soil Biology*, *45*, 466–472.
- Figuerola, E. L. M., Guerrero, L. D., Türkowsky, D., Wall, L. G., & Erijman, L. (2014). Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. *Environmental Microbiology*, *17*, 678–688.
- Frank, D. A., Gehring, C. A., Machut, L., & Phillips, M. (2003). Soil community composition and the regulation of grazed temperate grassland. *Oecologia*, *137*, 603–609.
- Froni, L. (2006). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Garbeva, P., van Elsas, J. D., & van Veen, J. A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and Soil*, *302*, 19–32.
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2003). Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*, *45*, 302–316. <http://doi.org/10.1007/s00248-002-2034-8>
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2004). Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiology Ecology*, *47*, 51–64.
- García, A., & Morón, A. (1992). Estudios de C, N y P en la biomasa microbiana del suelo en tres sistemas de rotación agrícola. *Investigaciones Agronómicas*, *1*, 111–126.
- Geels, F. P., & Schippers, B. (1983). Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathologische Zeitschrift*, *108*, 193–206.
- Girvan, M., Bullimore, J., Pretty, J., Osborn, A., & Ball, A. (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.

- González, M., Gallardo, J., Gómez, E., Masciandaro, G., Ceccanti, B., & Pajares, S. (2007). Potential universal applicability of soil bioindicators: evaluation in three temperate ecosystems. *Ciencias Del Suelo (Argentina)*, *25*, 151–158.
- Gorlach-Lira, K., & Stefaniak, O. (2009). Antagonistic activity of bacteria isolated from crops cultivated in a rotation system and a monoculture against *Pythium debaryanum* and *Fusarium oxysporum*. *Folia Microbiologica*, *54*, 447–50.
- Gosling, P., Ozaki, A., Jones, J., Turner, M., Rayns, F., & Bending, G. D. (2010). Organic management of tilled agricultural soils results in a rapid increase in colonisation potential and spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *139*, 273–279.
- Govaerts, B., Mezzalama, M., Sayre, K. D., Crossa, J., Lichter, K., Troch, V., ... Deckers, J. (2008). Long-term consequences of tillage, residue management, and crop rotation on selected soil micro-flora groups in the subtropical highlands. *Applied Soil Ecology*, *38*, 197–210.
- Grayston, S. J., Wang, S., Campbell, C. D., & Edwards, A. C. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, *30*, 369–378.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., & Bailey, M. J. (2003). Physiology and community responses of established grasslands bacterial populations to water stress. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 6961–6968.
- Helgason, B. L., Walley, F. L., & Germida, J. J. (2010). Long-term no-till management affects microbial biomass but not community composition in Canadian prairie agroecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*, 2192–2202.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., & Smalla, K. (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.
- Houlden, A., Timms-Wilson, T., Day, M., & Bailey, M. (2008). Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology*, *65*, 193–201.
- Hunter-Cevera, J. C. (1998). The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, *1*, 278–85.
- Inbar, E., Green, S., Hadar, Y., & D, M. (2005). Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of Streptomycetes. *Microbial Ecology*, *50*, 73–81.
- Jangid, K., Williams, M. a., Franzluebbers, A. J., Schmidt, T. M., Coleman, D. C., & Whitman, W. B. (2011). Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. *Soil Biology and Biochemistry*, *43*, 2184–2193.

- Jesus, E. da C., Marsh, T. L., Tiedje, J. M., & de S Moreira, F. M. (2009). Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal*, 3, 1004–11.
- Kennedy, A. C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74, 65–76.
- Kennedy, A. C., & Smith, K. L. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 170, 75–86.
- King, E., Ward, M., & Raney, D. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301–307.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169–188.
- Kloepper, J. W. (1995). Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In Y. Okon (Ed.), *Azospirillum/Plant Associations*. (pp. 137–166). Boca Raton: CRC Press.
- Kowalchuk, G. A., Buma, D. S., de Boer, W., Klinkhamer, P. G., & van Veen, J. A. (2002). Effects of aboveground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 509–520.
- Kuramae, E. E., Yergeau, E., Wong, L. C., Pijl, A. S., van Veen, J. a, & Kowalchuk, G. a. (2012). Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 12–24.
- Kuske, C. R., Ticknor, L. O., Miller, M. E., Dunbar, J. M., Davis, J. A., Barns, S. M., & 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.
- Lamb, E., Kennedy, N., & Siciliano, S. (2011). Effects of plant species richness and evenness on soil microbial community diversity and function. *Plant Soil*, 338, 483–495.
- Landa, B. B., Mavrodi, O. V, Schroeder, K. L., Allende-Molar, R., & Weller, D. M. (2006). Enrichment and genotypic diversity of pHlD-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 351–68.
- Larkin, R. P. (2003). Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1451–1466.
- Larkin, R. P. (2008). Relative effects of biological amendments and crop rotations on soil microbial communities and soilborne diseases of potato. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(6), 1341–1351.

- Larkin, R. P., Griffin, T. S., & Honeycutt, C. W. (2010). Rotation and cover crop effects on soilborne potato diseases, tuber yield, and soil microbial communities. *Plant Disease*, *94*, 1491–1502.
- Larkin, R. P., & Honeycutt, C. W. (2006). Effects of different 3-year cropping systems on soil microbial communities and rhizoctonia diseases of potato. *Phytopathology*, *96*, 68–79.
- Larkin, R. P., Honeycutt, C. W., Griffin, T. S., Olanya, O. M., Halloran, J. M., & He, Z. (2011). Effects of different potato cropping system approaches and water management on soilborne diseases and soil microbial communities. *Phytopathology*, *101*, 58–67.
- Larkin, R. P., Honeycutt, C. W., & Olanya, O. M. (2011). Management of Verticillium Wilt of Potato with Disease-Suppressive Green Manures and as Affected by Previous Cropping History. *Plant Disease*, *95*, 568–576.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F., & Lemanceau, P. (1996). The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*, 2449–2456.
- Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Aanderud, Z., Lennon, J., & Fierer, N. (2013). Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME J*, *7*, 1641–1650.
- Leoni, C., & Ghini, R. (2003). Efeito do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade in vitro a *Phytophthora nicotianae*. *Fitopatologia Brasileira*, *28*, 67–75.
- Li, Q., Wu, F., Yang, Y., & Wang, X. (2009). Effects of rotation and interplanting on soil bacterial communities and cucumber yield. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science*, *59*, 431–439.
- Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H.-J., & van Pée, K.-H. (2000). Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science*, *56*, 688–695.
- Liu, B., Gumpertz, M. L., Hu, S., & Ristaino, J. B. (2007). Long-term effects of organic and synthetic soil fertility amendments on soil microbial communities and the development of southern blight. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*, 2302–2316.
- Lupwayi, N. Z., Brandt, S. a., Harker, K. N., O'Donovan, J. T., Clayton, G. W., & Turkington, T. K. (2010). Contrasting soil microbial responses to fertilizers and herbicides in a canola–barley rotation. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*, 1997–2004.
- Lupwayi, N. Z., Lafond, G. P., Ziadi, N., & Grant, C. a. (2012). Soil microbial response to nitrogen fertilizer and tillage in barley and corn. *Soil and Tillage Research*, *118*, 139–146. <http://doi.org/10.1016/j.still.2011.11.006>
- Lupwayi, N. Z., Rice, W. A., & Clayton, G. W. (1998). Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry*, *30*, 1733–1741.
- Maul, J., & Drinkwater, L. (2010). Short-term plant species impact on microbial community structure in soils with long-term agricultural history. *Plant Soil*, *330*, 369–382.

- McCaig, A. E., Glover, L. A., & Prosser, J. I. (2001). Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 4554–4559.
- Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H., & Tebbe, C. C. (2000). Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology*, *40*, 43–56.
- Morón, A. (2003). Principales contribuciones del experimento de rotaciones cultivos-pasturas de INIA-La Estanzuela en el área de fertilidad de suelos (1963-2003). *INIA, Serie Técnica*, *134*, 25–35.
- Morón, A., & Díaz, R. (2003). *Simposio: 40 años de rotaciones agrícolas-ganaderas*. (A. Morón & R. Díaz, Eds.) *Serie Técnica* (Vol. 134, p. 86). Montevideo: Editorial Hemisferio Sur.
- Morón, A., & Sawchick, J. (2002). Soil quality indicators in long-term crop-pasture rotation experiment in Uruguay. In *Symposium n° 32, 17th WCSS* (p. 1327). Thailand.
- Muyzer, G., de Waal, E., & Uitierlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified genes coding for 16SrRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*, 695–700.
- Neilson, J. W., Jordan, F. L., & Maier, R. M. (2013). Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative. *Journal of Microbiological Methods*, *92*, 256–263.
- Ngosong, C., Jarosch, M., Raupp, J., Neumann, E., & Ruess, L. (2010). The impact of farming practice on soil microorganisms and arbuscular mycorrhizal fungi: Crop type versus long-term mineral and organic fertilization. *Applied Soil Ecology*, *46*, 134–142.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., ... Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, *178*, 5636–43.
- Öhlinger, R. (1996). Soil sampling and sample preparation. In F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, & R. Margesin (Eds.), *Methods in soil biology*. (pp. 7–11). Berlin/Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag.
- Orr, C. H., James, A., Leifert, C., Cooper, J. M., & Cummings, S. P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*, 911–9.
- Orr, C. H., Leifert, C., Cummings, S. P., & Cooper, J. M. (2012). Impacts of organic and conventional crop management on diversity and activity of free-living nitrogen fixing bacteria and total bacteria are subsidiary to temporal effects. *PLoS One*, *7*, e52891.
- Ovreäs, L. (2000). Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, *3*, 236–251.

- Ovreäs, L., & Torsvik, V. V. (1998). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, *36*, 303–315.
- Peixoto, R., da Costa Coutinho, H., Rumjanek, N., Macrae, A., & Rosado, A. (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*, 316–20.
- Peixoto, R. S., Chaer, G. M., Franco, N., Reis Junior, F. B., Mendes, I. C., & Rosado, a S. (2010). A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. *Antonie van Leeuwenhoek*, *98*, 403–13.
- Peixoto, R. S., Coutinho, H. L. C., Madari, B., Machado, P. L. O. a., Rumjanek, N. G., Van Elsas, J. D., ... Rosado, A. S. (2006). Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. *Soil and Tillage Research*, *90*, 16–28.
- Pereira e Silva, M. C., Semenov, A. V, van Elsas, J. D., & Salles, J. F. (2011). Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiology Ecology*, *77*, 57–68.
- Pereyra, C., Aguilar, C., Sicardi, M., & Frioni, L. (2003). Actividad microbiológica en suelos bajo sistemas de labranza conservacionista. In *VI Encuentro Nacional de Microbiólogos* (p. 89). Montevideo, Uruguay.
- Perucci, P., Bonciarelli, U., Santilocchi, R., & Bianchi, a. a. (1997). Effect of rotation, nitrogen fertilization and management of crop residues on some chemical, microbiological and biochemical properties of soil. *Biology and Fertility of Soils*, *24*, 311–316.
- Poly, F., Monrozier, L. J., & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, *152*, 95–103.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, *321*, 341–361.
- Rastogi, G., & Sani, R. K. (2011). Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. In Ahmad (Ed.), *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications* (pp. 29–58). Springer Science+Business Media.
- Rondon, M. R., Goodman, R. M., & Handelsman, J. (1999). The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Tibtech*, *17*, 403–409.
- Rotenberg, D., Joshi, R., Benitez, M.-S., Chapin, L. G., Camp, A., Zumpetta, C., ... Gardener, B. B. M. (2007). Farm Management Effects on Rhizosphere Colonization by Native Populations of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas* spp. and Their Contributions to Crop Health. *Phytopathology*, *97*, 756–66.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Second Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- Schinner, F. (1996). Introduction. In F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, & R. Margesin (Eds.), *Methods in soil biology* (pp. 3–6). Berlin/Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag.
- Schmalenberger, A., & Tebbe, C. (2003). Bacterial diversity in maize rhizosphere: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*, *12*, 251–262.
- Schoenholtz, S. H., van Miegroet, H., & Burger, J. A. (2000). A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. *Forest Ecology and Management*, *138*, 335–356.
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1963). *The Mathematical Theory of Communication* (Fifth ed.). Chicago, IL: Urbana University of Illinois Press.
- Sharma, M. P., Gupta, S., Sharma, S. K., & Vyas, A. K. (2012). Effect of tillage and crop sequences on arbuscular mycorrhizal symbiosis and soil enzyme activities in soybean (*Glycine max*) rhizosphere. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, *82*, 25–30.
- Sharma, S., Ramesh, A., Sharma, M., Joshi, O., & Govaerts, B. (2011). Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality. *Sustainable Agriculture Reviews*, *5*, 317–358.
- Sicardi, M., García Préchac, F., & Frioni, L. (2004). Soil microbial indicators sensitive to land use conversion from pastures to commercial *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) plantations in Uruguay. *Applied Soil Ecology*, *27*, 125–133.
- Simonet, P., Grosjean, M. C., Misra, a K., Nazaret, S., Cournoyer, B., & Normand, P. (1991). *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*, 3278–86.
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., & Wernars, K. (2001). Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 2284–2291.
- Stevenson, K. E., & Segner, W. P. (1992). Mesophilic aerobic sporeformers. In C. Vanderzant & D. F. Splittstoesser (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (3rd Editio, pp. 265–274). Washington DC: American Public Health Association.
- Svercel, M., Christen, D., Moëne-Loccoz, Y., Duffy, B., & Défago, G. (2009). Effect of long-term vineyard monoculture on rhizosphere populations of pseudomonads carrying the antimicrobial biosynthetic genes *phlD* and/or *hcnAB*. *FEMS Microbiology Ecology*, *68*, 25–36.
- Tang, H., Yu, M., Wang, Y., Han, X., Wang, X., Jin, W., ... Wei, D. (2012). Effects of long-term fertilization on *nifH* gene diversity in agricultural black soil. *African Journal of Microbiology Research*, *6*, 2659–2666.

- Ter Braak, C. J., & Smilauer, P. (1998). *CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows*. Wageningen, The Netherlands: Centre for Biometry.
- Terra, J. A., & García Préchac, F. (2001). Siembra directa y rotaciones forrajeras en las lomadas del este: síntesis 1995-2000. *Serie Técnica*, 125.
- Terra, J. A., & García Préchac, F. (2002). Soil organic carbon content of a typic argiudoll in Uruguay under forage crops and pastures for direct grazing: effect of tillage intensity and rotation system. In E. van Santen (Ed.), *Making Conservation Tillage Conventional: Building a Future on 25 Years of Research. Proc. of 25th Annual Southern Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture* (pp. 70–73). Auburn, AL, USA: Alabama Agric. Expt. Stn. and Auburn University.
- Terra, J. A., García Préchac, F., Salvo, L., & Hernández, J. (2006). Soil use intensity impact on total and particulate soil organic matter in no till crop-pasture rotations under direct grazing. *Advances in GeoEcology*, 38, 233–241.
- Tian, Y., Zhang, X., Liu, J., Chen, Q., & Gao, L. (2009). Microbial properties of rhizosphere soils as affected by rotation, grafting, and soil sterilization in intensive vegetable production systems. *Scientia Horticulturae*, 123, 139–147.
- Van Bruggen, A. H. C., & Semenov, A. M. (2000). In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, 15, 13–24.
- Van Elsas, J. D., Garbeva, P., & Salles, J. (2002). Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation*, 13, 29–40.
- Viebahn, M., Doornbos, R., Wernars, K., van Loon, L. C., Smit, E., & Bakker, P. a H. M. (2005). Ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat are not affected by introductions of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r. *Environmental Microbiology*, 7, 1775–85.
- Viebahn, M., Glandorf, D. C. M., Ouwens, T. W. M., Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K., ... Bakker, P. A. H. M. (2003). Repeated introduction of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r without intensified effects on the indigenous microflora of field-grown wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3110–3118.
- Viebahn, M., Wernars, K., Smit, E., van Loon, L. C., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., & Bakker, P. A. H. M. (2006). Microbial diversity in wheat rhizosphere as affected by genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r. *IOBC/wprs Bulletin*, 29(2), 167–172.
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., & Melillo, J. M. (1997). Human domination of earth's ecosystems. *Science*, 277, 494–499.
- Wakelin, S. a., Gregg, A. L., Simpson, R. J., Li, G. D., Riley, I. T., & McKay, A. C. (2009). Pasture management clearly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria. *Pedobiologia*, 52(4), 237–251.

- Wakelin, S. A., Gupta, V. V. S. R., & Forrester, S. T. (2010). Regional and local factors affecting diversity, abundance and activity of free-living, N<sub>2</sub>-fixing bacteria in Australian agricultural soils. *Pedobiologia*, *53*, 391–399.
- Wakelin, S. A., Macdonald, L. M., Rogers, S. L., Gregg, A. L., Bolger, T. P., & Baldock, J. a. (2008). Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*, 803–813.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, *52*, 487–511.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Gillevet, P. M., Watrud, L. S., & Di Giovanni, G. D. (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 2545–53.
- Wieland, G., Neumann, R., & Backhaus, H. (2001). Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 5849–5854.
- Wu, F., Yu, H., Yu, G., Pan, K., & Bao, J. (2011). Improved bacterial community diversity and cucumber yields in a rotation with kidney bean–celery–cucumber. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science*, *61*, 122–128.
- Wu, T., Chellemi, D. O., Graham, J. H., Martin, K. J., & Roskopf, E. N. (2008). Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. *Microbial Ecology*, *55*, 293–310.
- Xuan, D. T., Guong, V. T., Rosling, A., Alström, S., Chai, B., & Högberg, N. (2011). Different crop rotation systems as drivers of change in soil bacterial community structure and yield of rice, *Oryza sativa*. *Biology and Fertility of Soils*, *48*, 217–225.
- Zarea, M. J., Ghalavand, A., Goltapeh, E. M., Rejali, F., & Zamaniyan, M. (2009). Effects of mixed cropping, earthworms (*Pheretima* sp.), and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae*) on plant yield, mycorrhizal colonization rate, soil microbial biomass, and nitrogenase activity of free-living rhizosphere bacteria. *Pedobiologia*, *52*, 223–235.
- Zelles, L., Bai, Q. Y., Beck, T., & Beese, F. (1992). Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *24*, 317–323.
- Zelles, L., Bai, Q. Y., Rackwitz, R., Chadwick, D., & Beese, F. (1995). Determination of phospholipid- and lipopolysaccharide-derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structures in soils. *Biology and Fertility of Soil*, *19*, 115–123.
- Zerbino, M. S. (2010). Evaluación de la macrofauna del suelo en rotaciones cultivos-pasturas con laboreo convencional. *Acta Zoológica Mexicana (nueva Serie)*, *2*, 189–202.
- Zerbino, M. S. (2012). Efecto de rotaciones cultivo-pasturas en siembra directa, con pastoreo, sobre comunidades de Oligochaeta. *Agrociencia*, *16*, 15–23.