

IMPACTO A LARGO PLAZO DE LA FERTILIZACIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DEL SUELO

JIMENA ORTIZ^{1*}; VALERIA SOLEDAD FAGGIOLI¹; HUGO GHIO²; MONICA FABIOLA BOCCOLINI¹; JUAN PABLO IOELE¹; PABLO TAMBURRINI³; FERNANDO O. GARCIA⁴; VICENTE GUDELJ¹

Recibido: 20/12/2018

Recibido con revisiones: 25/11/2019

Aceptado: 03/12/2019

RESUMEN

Para un manejo sustentable no se deben desconocer los efectos de la fertilización sobre el suelo y sus procesos microbianos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto acumulado de diferentes dosis de fertilización sobre las comunidades microbianas del suelo en dos profundidades (0-5 cm y 5-10 cm). El trabajo se realizó sobre un ensayo de campo con aplicación incorporada de fertilizantes desde 1999. Las dosis de fertilización evaluadas fueron: testigo (T), dosis de productor (DP), dosis de reposición (DR) y dosis de reposición con agregado de micronutrientes (DRM). Se midieron variables de estructura (DGGE), actividades enzimáticas de hidrólisis del diacetato de fluoresceína, fosfatasa ácida, ureasa y arilsulfatasa, nitrógeno potencialmente mineralizable (NAN) y glomalinas. La fertilización afectó diferencialmente las funciones microbiológicas en las dos profundidades. Los valores de ureasa fueron mayores en T a 0-5 cm. Los valores de NAN fueron superiores en T y DP a 0-5 cm y en T a 5-10 cm. En cambio, fosfatasa y glomalinas predominaron en DR y DRM. La acidez del suelo y volumen de rastrojo generados por la fertilización habrían ocasionado los elevados valores de fosfatasa y glomalinas. La disminución de NAN en altas dosis de fertilización respondería al incremento de la mineralización generado por el agregado de nutrientes (efecto "priming"). La estructura de la comunidad microbiana fue afectada por la fertilización en diferente medida según la profundidad de muestreo. En 0-5 cm la riqueza y diversidad fueron similares entre tratamientos. En cambio, en 5-10 cm, ambos índices fueron drásticamente afectados por la aplicación de fertilizantes. El índice de diversidad de Shannon fue de 2,21 y 2,20 en T y DP; y 1,4 y 1,39 en DR y DRM. Sólo se hallaron correlaciones significativas entre la actividad enzimática y la comunidad bacteriana en la profundidad 0-5 cm. El mantenimiento de la sustentabilidad de los agroecosistemas depende en gran medida del equilibrio entre la estructura y las funciones biológicas provistas por los microorganismos del suelo. Esperamos que este aporte constituya una herramienta más para tener en cuenta al momento de tomar decisiones sobre el manejo de fertilización a largo plazo en cultivos.

Palabras claves: Actividad enzimática, DGGE, nitrógeno potencialmente mineralizable, comunidad bacteriana.

LONG-TERM IMPACT OF FERTILIZATION ON THE STRUCTURE AND FUNCTIONALITY OF MICROBIAL SOIL COMMUNITY

ABSTRACT

To understand effects of fertilization on microbial communities and processes a long-term fertilization treatment was performed. Since 1999, a field experiment was conducted and variables of structure (DGGE), enzymatic activity (phosphatase, urease, arylsulfatase), potentially mineralizable nitrogen (NAN) and glomalins were measured at two depths (0-5 cm and 5-10 cm). At both depths, fertilizer rates affected microbiological functions of the biomass community differentially. Urease activity was higher for the Control treatment at 0-5 cm depth, while NAN activity was higher for the Control and the Farmer Rate treatment at 0-5 cm and also in the Control treatment at 5-10 cm depth. Phosphatase and glomalin levels were higher for Reposition Rate treatment. Soil acidity and harvest residue volume generated by fertilization could have caused high phosphatase and glomalins values. NAN decrease at higher fertilization rates could have been caused by the mineralization increase generated by the nutrient addition ("priming" effect). Microbial community structure was affected differently by fertilization according to sampling depth. At 0-5 cm depth, richness and evenness were similar between treatments, while at 5-10 cm depth, both indexes were drastically affected by fertilizer application. Evenness was 2.21 and 2.20 for Control and Farmer Rate treatment, and 1.4 and 1.39 for Reposition Rate treatment. Significant correlations were found between the enzymatic activity and the microbial structure at 0-5 cm depth. The sustainability of agroecosystems depends on the balance between the structure and the biological functions provided by soil microorganisms. We hope this study will be crop management decision tool.

Keywords: Enzymatic activity, DGGE, potentially mineralizable nitrogen, bacterial community.

1 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina

2 Asociación Argentina de Productores en Siembra directa (AAPRESID). Argentina

3 Nutrien Ag Solutions. Argentina

4 Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP); Balcarce; Argentina.

* Autor de contacto: ortiz.jimena@inta.gob.ar

INTRODUCCIÓN

El uso de fertilizantes es una de las prácticas de manejo más importantes para suplir nutrientes e incrementar el rendimiento de los cultivos y la calidad del grano. En cada campaña, nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S) son aportados para la producción de cereales y oleaginosas. Los cultivos de mayor importancia económica en Argentina son maíz, trigo y soja que ocupan 4,25; 3,7 y 20,7 mill ha, respectivamente, con una dosis promedio de fertilizantes de 186; 131 y 46 kg ha⁻¹ (Fertilizar, 2016).

Aunque la fertilización va destinada a los cultivos, también incide sobre los organismos que habitan el suelo debido a las alteraciones en las propiedades del físico-químicas (Correa, 2016). Al aplicar un fertilizante, la alteración inmediata es el incremento en la disponibilidad de nutrientes, pero a largo plazo la acidificación del suelo es el principal efecto negativo causado por la práctica de fertilización (Wallace, 1994). Una revisión de 34 casos analizados demostró que en 84% de los mismos la comunidad microbiana fue sensible a la fertilización (Geisseler & Scott, 2014). Zhalnina *et al.*, (2015) observaron que los cambios en la composición, diversidad y biomasa microbiana se debieron al pH del suelo. En tanto que, a partir de un relevamiento a escala global, Fierer (2017) realizó una jerarquización de los factores bióticos y abióticos que influyen sobre las comunidades bacterianas y halló que el pH del suelo es el parámetro de mayor importancia.

Los microorganismos del suelo intervienen en el ciclo de los nutrientes a través de la regulación de los procesos de mineralización de materia orgánica y mantenimiento de los stocks de nutrientes en el suelo. Las técnicas moleculares han permitido un gran avance en el estudio de la composición de las comunidades microbianas (Van Elsas *et al.*, 2019). En tanto que las maneras más habituales de cuantificar las funciones llevadas a cabo por los microorganismos es través de la actividad de enzimas tales como la fosfatasa, arilsulfatasa y ureasa que intervienen en la mineralización de P, S y N, respectivamente (Nannipieri *et al.*, 2003; Ferreras *et al.*, 2009). Los nutrientes retenidos en estructuras orgánicas representan

una medida de su grado de conservación dentro del sistema (Hirsch, 2019). Por ejemplo, fracciones del N orgánico pueden estimarse a través del N potencialmente mineralizable (NAN) y en estructuras proteicas del suelo, tales como las denominadas “glomalininas” (Wright & Upadhyaya, 1999; Echeverría *et al.*, 2000). Esta última también se ha citado como un agente cementante de agregados (Rillig, 2004). Un suelo estable mantendrá una óptima diversidad biológica y un equilibrio entre la conservación de recursos y la mineralización.

El impacto de la fertilización sobre los microorganismos depende del tipo de fertilizante, la dosis y el método de aplicación (Soares Rosado *et al.*, 2019). Numerosos estudios tendientes a cuantificar el efecto de prácticas agronómicas sobre comunidades microbianas del suelo se realizaron a una determinada profundidad en los primeros centímetros de la superficie (Chakraborty *et al.*, 2011; Bocolini *et al.*, 2016; Correa, 2016). Sin embargo, la incorporación subsuperficial de fertilizantes podría afectar a los microorganismos que habitan en capas más cercanas al sitio de la aplicación (Geisseler & Scott, 2014). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto acumulado de diferentes dosis de fertilización sobre la composición y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo en dos profundidades (0-5 cm y 5-10 cm).

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del ensayo y diseño experimental

El estudio se realizó en un ensayo de fertilización de larga duración iniciado en el año 1999 en Camilo Aldao, provincia de Córdoba (33° 11' 20,09" S, 61° 58' 49,34" O). El suelo del sitio es un Argiudol Típico de textura franco limosa perteneciente a la serie Hansen (INTA, 1985). El diseño experimental fue de franjas de 6000 m² para cada tratamiento (30 m de ancho por 200 m de largo). La rotación realizada fue maíz – trigo/soja. Los tratamientos evaluados fueron: Testigo sin fertilización (T) y tres situaciones de fertilización con NPS: Dosis de productor (DP), Dosis de reposición (DR) y Dosis de reposición con el agregado de micronutrientes (Zn y B) (DRM). La dosis

de productor fue 80 Kg ha⁻¹ de N, 17 Kg ha⁻¹ de P y 15 Kg ha⁻¹ S, para maíz, y 80 Kg ha⁻¹ de N, 21 Kg ha⁻¹ de P y 14 Kg ha⁻¹ S, para trigo/soja.

La determinación de la dosis de reposición se realizó en función de un rendimiento objetivo definido para cada cultivo y los requerimientos por tonelada de grano de cada uno de ellos, utilizando el valor referenciado de Echeverría & García (2014). En maíz se definió un rendimiento objetivo de 12000 kg ha⁻¹, por lo cual se aplicó 264 kg ha⁻¹ de N; 48 kg ha⁻¹ de P y 48 kg ha⁻¹ de S en DR, mientras que en el tratamiento DRM se aplicó además de la dosis anterior 0,24 kg ha⁻¹ de B y 0,64 kg ha⁻¹ de Zn. Para el trigo se definió un rendimiento de 5000 kg ha⁻¹ y se aplicó 150 kg ha⁻¹ de N, 25 kg ha⁻¹ de P y 25 kg ha⁻¹ de S para el tratamiento DR, mientras que en el tratamiento DRM se aplicó además de la dosis anterior 0,125 kg ha⁻¹ de B y 0,26 kg ha⁻¹ de Zn. En soja se definió un rendimiento de 3400 kg ha⁻¹ y se consideró que un 60% del N de la soja proviene de la fijación biológica, según lo evaluado por Salvagiotti *et al.* (2015), por lo cual la aplicación de fertilizante en el tratamiento DR fue 102 kg ha⁻¹ de N, 23,8 kg ha⁻¹ de P y 15,3 kg ha⁻¹ de S, mientras que en el tratamiento DRM se aplicó además 0,085 Kg ha⁻¹ de B y 0,20 Kg ha⁻¹ de Zn.

La aplicación de los fertilizantes se realizó anualmente en las mismas parcelas, según el tratamiento, por debajo al costado de la semilla (N y S) o en la línea de siembra (P).

El muestreo se realizó previo a la siembra del cultivo estival en septiembre de 2015 (16 años de duración del experimento). La toma de muestras fue realizada teniendo en cuenta un área representativa dentro de cada franja de 6000 m². Cada área fue dividida en tres subáreas (20x 100 m), a lo largo de las cuales se tomaron muestras compuestas por 20 submuestras cada una, a dos profundidades: 0-5 y 5-10 cm; de manera de obtener pseudoréplicas para cada tratamiento, ya que cada parcela representa un tratamiento y por lo tanto no es posible obtener réplicas verdaderas dadas las características del experimento. Las muestras fueron tamizadas (malla de 2 mm), y una fracción de la muestra se conservó a 4°C hasta la determinación de la actividad mi-

crobiana y otra porción se conservó a -20°C para la extracción del ADN genómico.

Determinaciones en suelo

El pH del suelo fue medido a una relación suelo agua 1:2,5 (IRAM 29410, 1999). Las variables microbiológicas medidas fueron: actividad enzimática global por la hidrólisis de fluoresceína diaacetato (FDA) (Adam & Ducan, 2001), actividad de fosfatasa ácida (Tabatabai & Bremner, 1969), ureasa (Tabatabai & Bremner, 1972) y arilsulfatasa (Tabatabai & Bremner, 1970), nitrógeno anaeróbico potencialmente mineralizable (NAN) (Echeverría *et al.*, 2000) y proteínas fácilmente extraíbles reactivas a Bradford, comúnmente denominadas "glomalininas" (Wright & Upadhyaya, 1999).

La extracción de ADN se realizó a partir de 0,25 g de suelo con kit comercial Power soil (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, CA). Para la amplificación del gen 16S ARNr se realizó una PCR con el set de *primers* R534 y F341-GC que codifican para la región variable V3 de 200 pb (Muyzer *et al.*, 1994). Los productos PCR fueron separados en electroforesis mediante la técnica DGGE (Muyzer *et al.*, 1993). Se prepararon geles de poliacrilamida al 8% con un gradiente lineal desnaturante de 40 a 60%. Las condiciones de electroforesis fueron a 60 V durante 16 h a 60°C. Los geles se tiñeron con GelRed en TAE 1X durante 45 min y se visualizaron bajo luz UV. Los perfiles DGGE fueron digitalizados y analizados con el software Gel Compare II (Applied Maths). La posición y la intensidad de las bandas fueron utilizadas para posteriores análisis estadísticos y estimación de índices de diversidad Shannon-Wiener (Shannon, 1948) y riqueza (Menhnick, 1964).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos microbiológicos se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se aplicó un Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM) tomando como efecto fijo los tratamientos de fertilización y las profundidades, y como efectos aleatorios a las repeticiones de campo. Cuando el p-valor del test

fue $p < 0,05$ se compararon las medias por el test DGC con significancias del 5%. La comparación en la composición de las comunidades se realizó mediante análisis de permutaciones y múltiple ANOVA (permanova). El gráfico de composición de comunidades se realizó en base a un PCO (Principal Coordinate Analysis) con el paquete *labsdv* de R (R Development Core Team, 2018). Se estimaron correlaciones lineales entre las variables microbiológicas y las comunidades bacterianas con la función *envfit* del paquete *vegan* del software R, sólo se graficaron los vectores correlacionados significativamente ($p < 0,05$). También se realizó el análisis de correlación de Pearson entre el pH y la riqueza y diversidad de bacterias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento del pH del suelo

Una de las consecuencias negativas ocasionadas por la fertilización mineral es la disminución del pH del suelo. En este estudio los valores de pH fueron mayores en T respecto a los tratamientos DP, DR y DRM, tanto para la profundidad de 0-5 cm como para la profundidad de 5-10 cm. Hubo una disminución significativa del 10% 19%, y 20% del valor del pH entre T y los tratamientos DP, DRM y DR, respectivamente, en la profundidad de 0-5 cm (MGLM, $p < 0,05$) (**Tabla**

1). Mientras que en la profundidad de 5-10 cm, la disminución fue de 6%, 13%, y 16% entre T y los tratamientos DP, DRM y DR, respectivamente (MGLM, $p < 0,05$) (**Tabla 1**). Estos resultados concuerdan con estudios sobre ensayos de larga duración con fertilización mineral (Liang *et al.*, 2014; Boccolini *et al.*, 2016). Además, nuestra investigación demuestra que la reducción del pH se mantuvo y con la misma tendencia en ambos estratos muestreados (i.e. 0-5 cm y 5-10 cm).

Comportamiento microbiológico del suelo Funcionalidad de la comunidad microbiana

Las variables microbiológicas respondieron de manera diferencial según profundidad y dosis de fertilización (**Tabla 1**). La actividad enzimática global medida a través de FDA no fue afectada por las prácticas de fertilización, presentando los mayores valores en el estrato superficial (MGLM, $p < 0,05$) (**Tabla 1**). Esto responde a que a medida que se aumenta la distancia desde la superficie disminuye el número de microorganismos y sus actividades enzimáticas (Frey, 2007). Nuestros resultados coinciden con Morales *et al.*, (2016), quienes, en un suelo Hapludalf Típico en 0-10 cm de profundidad, luego de nueve años de fertilización mineral no observaron efectos significativos en la actividad de FDA. Mientras que

Tabla 1. Valores medios de pH del suelo, actividades enzimáticas (FDA, fosfatasa, arilsulfatasa, ureasa), nitrógeno potencialmente mineralizable (NAN) y glomalinas en los diferentes tratamientos de fertilización a 0-5 cm y 5-10 cm de profundidad.

Table 1. Mean soil pH, enzymatic activity (FDA, phosphatase, arylsulfatase, urease), anaerobic nitrogen (NAN) and glomalin values per fertilization treatment at 0-5 cm and 5-10 cm depth.

Efecto	pH	FDA $\mu\text{g fluor g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Fosfatasa $\mu\text{gPNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Glomalina ^(*) $\mu\text{g prot g}^{-1}$	NAN ppm	Ureasa $\mu\text{g urea g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Arilsulfatasa $\mu\text{gPNF g}^{-1}$
0-5 cm							
T	6,6 ± 0,02 a	90,0 ± 6,46 a	768,1 ± 1,00 c	409,6 ± 3,68 c	93,8 ± 5,66 a	25,25 ± 1,39 a	40,0 ± 7,04 a
DP	6,0 ± 0,03 b	107,0 ± 9,12 a	931,6 ± 31,58 b	441,9 ± 8,67 b	87,5 ± 2,65 a	20,07 ± 0,50 b	43,1 ± 9,18 a
DR	5,3 ± 0,01 d	76,2 ± 19,22 a	1013,9 ± 46,42 a	509,8 ± 7,71 a	49,7 ± 5,70 c	19,45 ± 0,65 b	39,9 ± 5,55 a
DRM	5,5 ± 0,05 c	112,0 ± 6,06 a	1149,7 ± 51,99 a	516,1 ± 12,40 a	66,5 ± 1,46 b	16,20 ± 0,35 c	14,8 ± 4,08 b
5-10 cm							
T	6,2 ± 0,06 a	42,2 ± 3,53 a	505,6 ± 20,32 a	375,3 ± 12,61 b	35,7 ± 1,07 a	13,6 ± 0,18 a	28,1 ± 3,96 b
DP	5,8 ± 0,02 b	42,6 ± 2,32 a	553,2 ± 40,23 a	392,2 ± 6,53 b	17,5 ± 0,70 b	10,5 ± 1,21 a	29,8 ± 6,96 b
DR	5,2 ± 0,00 d	45,4 ± 3,44 a	531,9 ± 56,55 a	434,3 ± 7,04 a	13,8 ± 1,24 b	4,9 ± 1,66 b	57,2 ± 5,37 a
DRM	5,4 ± 0,02 c	39,4 ± 1,24 a	556,9 ± 23,46 a	385,0 ± 5,73 b	15,6 ± 0,93 b	11,8 ± 0,99 a	41,2 ± 3,34 b

(*) Corresponde a compuestos proteicos reactivos a Bradford. Letras diferentes entre filas de una misma columna indican diferencias estadísticas significativas según MGLM y test DGC nivel de significancia 5%.

Chakraborty *et al.*, (2011) observaron mayor actividad de FDA en los tratamientos con fertilización mineral de NPK respecto al tratamiento control sin fertilización luego de 37 años. La ausencia de respuesta a la fertilización entre T y las diferentes estrategias de fertilización evaluadas en este estudio indica que la FDA es una variable biológica estable frente al efecto acumulado de la fertilización a largo plazo.

Respecto a las variables microbiológicas que respondieron a las dosis de fertilización, se hallaron dos grupos, uno conformado por fosfatasa y glomalina que respondieron con mayores valores en los tratamientos de mayor fertilización (i.e. DR y DRM), y un segundo grupo conformado por ureasa y NAN que tuvieron mayores valores en los tratamientos de nula a menor fertilización (i.e. T y DP) (MGLM, $p < 0,05$) (**Tabla 1**).

Para los primeros 5 cm, la actividad fosfatasa y glomalina presentaron valores superiores en los tratamientos DR y DRM. La glomalina, además, fue mayor en el tratamiento DR en la profundidad de 5-10 cm (MGLM, $p < 0,05$) (**Tabla 1**). Las glomalinas son sustancias compuestas por proteínas, lípidos y materiales húmicos altamente resistentes. Su presencia en el suelo ha sido vinculada a mejoras en las propiedades físicas del suelo y como una fuente de almacenamiento de N y C de larga duración (Rillig *et al.*, 2001). Aumentos en los contenidos de glomalinas en altas dosis de fertilización se han relacionado al aporte de material vegetal (Jun *et al.*, 2007), altos contenidos de P del suelo (Wu *et al.*, 2011) y siembra directa (Dai *et al.*, 2017). El mayor volumen de material vegetal en los tratamientos de alta fertilización podría explicar los mayores contenidos de glomalinas en DR y DRM en relación con los tratamientos T y DP a la profundidad de 0-5 cm.

Dick *et al.* (2000) observaron que la mayor actividad de la fosfatasa ácida se registró en rangos de pH de 5 a 5,5, mientras que por encima de esos valores la enzima disminuyó drásticamente en el suelo. En dicha investigación, el contenido de P no afectó la actividad fosfatasa, es decir, se observaron altos valores de fosfatasa en situaciones de elevada oferta de P. En cambio, DeForest *et al.* (2012) hallaron que el comportamiento de la enzima fue dependiente de la biodisponi-

bilidad inicial de P, observando una disminución de la actividad enzimática al agregarle P al suelo. Nuestros resultados coinciden con lo hallado por Dick *et al.* (2000), es decir, la actividad fosfatasa ácida fue significativamente mayor en los tratamientos con bajo pH (DR y DRM) (MGLM, $p < 0,05$) (**Tabla 1**). En un estudio realizado sobre el mismo experimento, se observó que dichos tratamientos presentaban los mayores valores de P extractable, con niveles de P (mg kg^{-1}) iguales a 39,9 en DRM; 38,9 en DR; 8,5 en DP; 4,7 en T (Gudelj *et al.*, 2017). Es decir que, en nuestra investigación, la mayor biodisponibilidad de P no inhibió la actividad enzimática tal como lo observó DeForest *et al.* (2012). Sin embargo, son necesarias más investigaciones tendientes a profundizar sobre la interacción de la biodisponibilidad de P y pH del suelo en ambientes de alta disponibilidad de P para comprender las consecuencias que los cambios en las propiedades del suelo producen en las funciones de las fosfatasas en el agroecosistema.

Las variables relacionadas al ciclo del N, ureasa y NAN, mantuvieron una tendencia similar de respuesta a los tratamientos de fertilización en ambas profundidades (**Tabla 1**). En 0-5 cm de profundidad, la actividad de la ureasa presentó los mayores valores en T, seguido de los tratamientos DP, DR y, por último, el tratamiento DRM (MGLM, $p < 0,05$) (**Tabla 1**). En 5-10 cm de profundidad, los contenidos de ureasa en T se igualaron a los contenidos del tratamiento DP, diferenciándose de los tratamientos DRM y DR, los cuales presentaron un contenido inferior (MGLM, $p < 0,05$) (**Tabla 1**). De manera similar, la variable NAN en 0-5 cm de profundidad fue superior en los tratamientos T y DP respecto a DRM y DR. En tanto que a 5-10 cm de profundidad, T registró el mayor valor en comparación con el resto de los tratamientos (MGLM, $p < 0,05$) (**Tabla 1**). Boccolini *et al.* (2016) también registró un menor contenido de NAN en las situaciones con mayores dosis de fertilizantes en un ensayo de fertilización nitrogenada de larga duración. Los autores sugieren que dicho comportamiento de NAN podría deberse a un aumento en la velocidad de mineralización de la materia orgánica particulada como consecuencia de la aplicación de N (Galantini

et al., 2008). Este efecto de la fertilización es denominado "priming" y se menciona con frecuencia asociado a la disminución de N potencialmente mineralizable (NAN) debido a que la aplicación de N aumenta el volumen de aportes de N orgánico y, como consecuencia se reduce el pool de N mineralizable del suelo (Kuzyakov *et al.*, 2000). Es probable, que este mecanismo también genere una menor actividad de las enzimas relacionadas al ciclo de N, tal como la ureasa. La disminución de esta enzima en respuesta a la fertilización nitrogenada ha sido citada por otros autores quienes la proponen como un indicador del grado de disturbio en los procesos biológicos debido a la fertilización (Ajwa *et al.*, 1999).

Las funciones relacionadas al ciclo del S fueron evaluadas mediante la actividad de la enzima arilsulfatasa (Tabla 1). En superficie (0-5 cm), presentó mayores valores en los tratamientos T, DP y DR; mientras que a la profundidad de 5-10 cm presentó mayores valores en los tratamientos DR y DRM (MGLM, $p < 0,05$) (Tabla 1). Similares resultados fueron reportados por Prietzel *et al.* (2001) quienes luego de una fertilización observaron que la actividad de la enzima arilsulfatasa en superficie (0-10 cm) era mayor en los trata-

mientos control respecto al tratamiento fertilizado, mientras que a mayor profundidad en ciertas épocas del año la actividad de la enzima aumentaba en los tratamientos fertilizados respecto al control sin fertilizante. Por otro lado, Liang *et al.* (2014) no observaron diferencias en la actividad de la enzima tanto en superficie como en profundidad, luego de 15 años de fertilización de reposición en una rotación Trigo-Maíz.

Estructura de la comunidad microbiana

La estructura de la comunidad bacteriana, estudiada mediante DGGE, fue afectada significativamente por los tratamientos de fertilización en diferente medida de acuerdo con la profundidad de muestreo (Figura 1). En los primeros 0-5 cm se registraron valores de riqueza (número de especies) y diversidad (índice de Shannon) similares en todos los tratamientos de fertilización (MLGM, $p > 0,05$) (Figura 2a, Figura 3a). En cambio, en la profundidad 5-10 cm, tanto la riqueza como la diversidad fueron significativamente menores en los tratamientos de alta fertilización DR y DRM (MLGM, $p < 0,05$) (Figura 2b, Figura 3b). El efecto negativo de la fertilización mineral a largo plazo sobre la comunidad bacte-

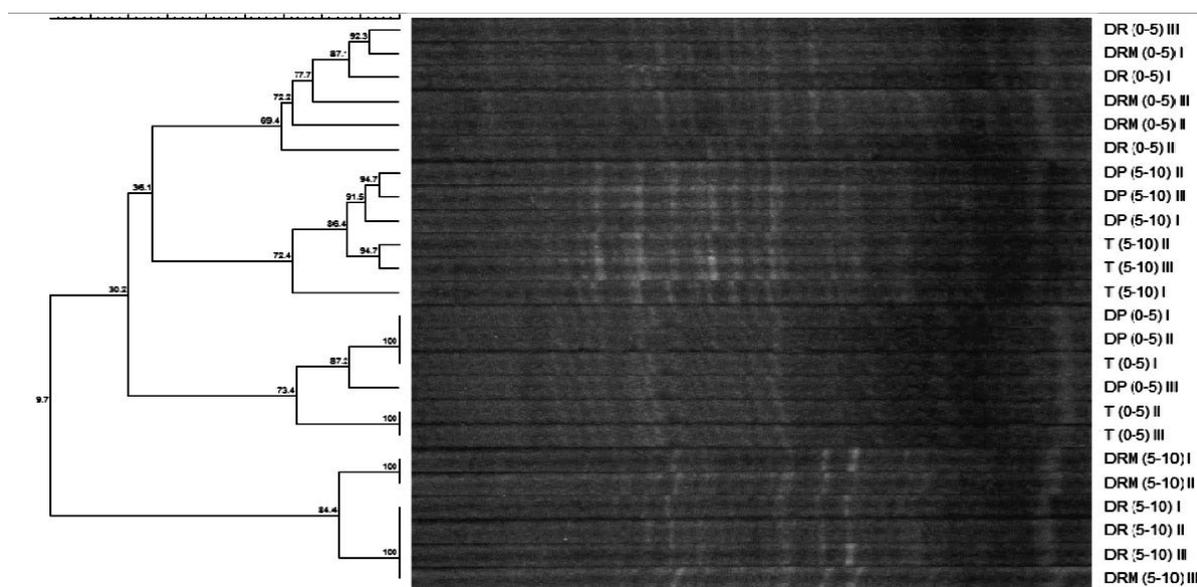


Figura 1. Conglomerados según Dice y UPGMA en base a DGGE de amplicones 16S rRNA T: Testigo, DP: Dosis de productor, DR: Dosis de reposición, DRM: DR + micronutrientes; (0-5) y (5-10) indican las profundidades (cm). I, II y III: Repeticiones de cada tratamiento. Se presenta sombreado el cluster que se separó del resto de los tratamientos.

Figure 1. Conglomerates according to Dice and UPGMA based on DGGE of 16S rRNA amplicons. T: Control without fertilization, DP: Farmer rate, DR: Replacement rate, DRM: DR + micronutrients; (0-5) and (5-10) indicate the depths (cm). I, II and III: Repetitions per plot. The cluster that was separated from the rest of the treatments was shaded.

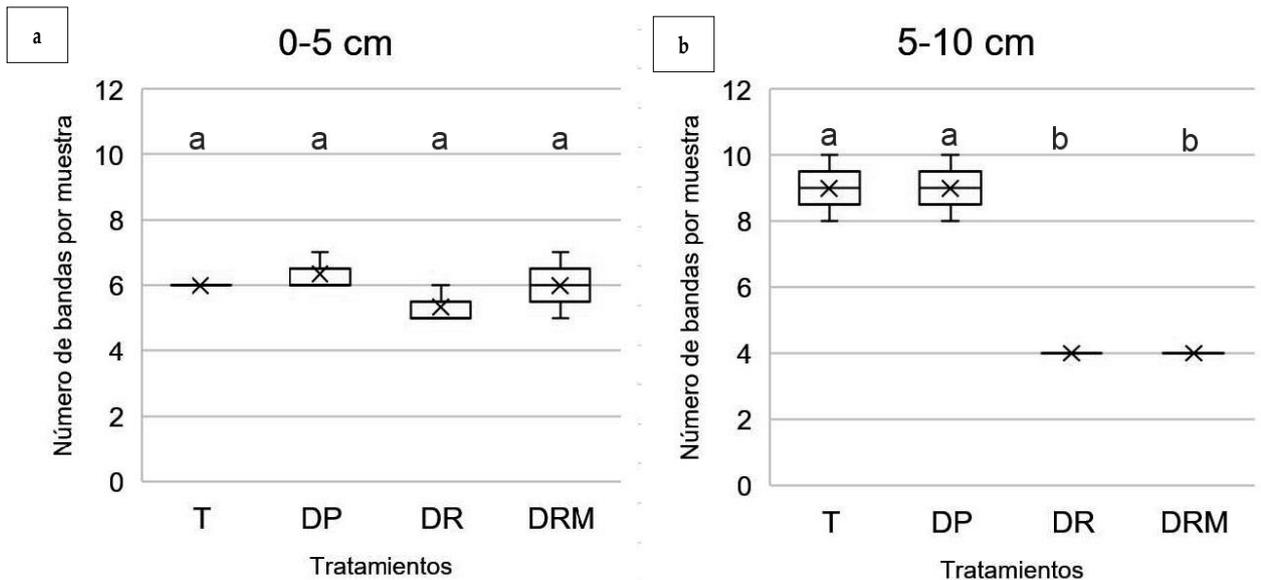


Figura 2. Riqueza de especies (número de bandas) obtenida mediante amplificación del gen 16S rRNA y DGGE a partir de muestras de suelo con diferentes tratamientos de fertilización: T: control sin fertilización, DP: Dosis de productor, DR: Dosis de reposición, DRM: Dosis de reposición más micronutrientes. A. profundidad 0-5 cm. B. Profundidad 5-10 cm. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de la misma profundidad (MLGM, Test DGC 5%).

Figure 2. Species richness (number of bands) obtained by amplification of the 16S rRNA gene and DGGE from soil samples with different fertilization plots: T: control without fertilization, DP: Farmer rate, DR: Replacement rate, DRM: Replacement rate + micronutrients. A. Depth 0-5 cm. B. Depth 5-10 cm. Different letters indicate statistically significant differences between plots for the same depth (MLGM, DGC Test 5%).

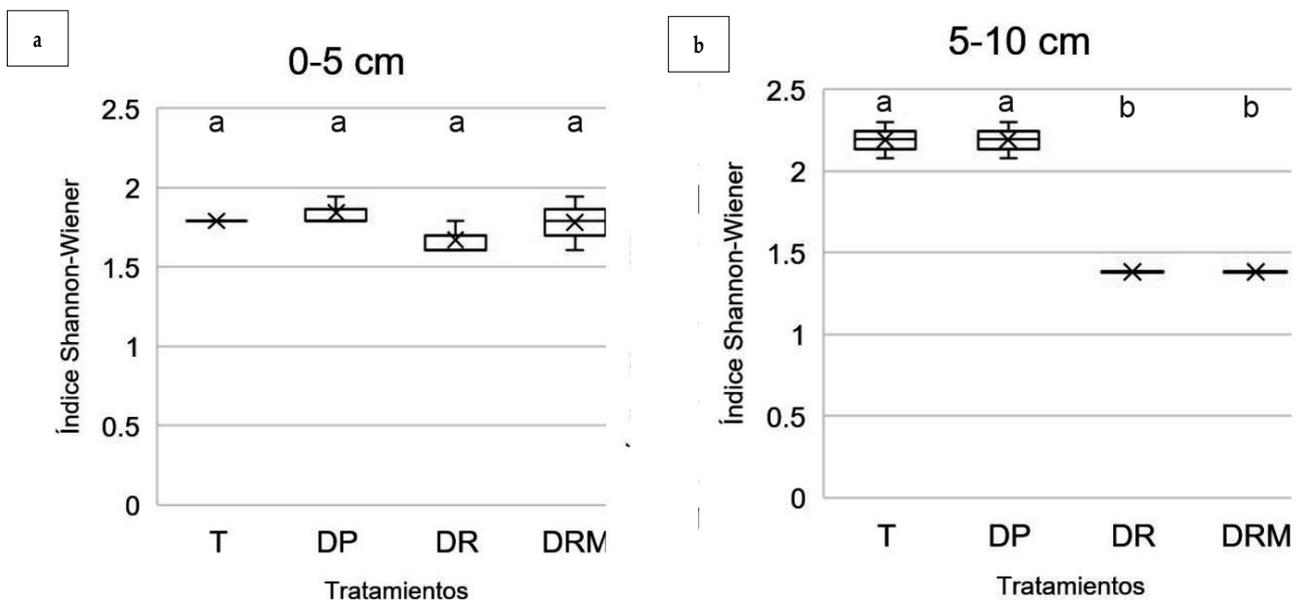


Figura 3. Diversidad de especies (índice Shannon-Wiener) obtenida mediante amplificación del gen 16S rRNA y DGGE a partir de muestras de suelo con diferentes tratamientos de fertilización: T: control sin fertilización, DP: Dosis de productor, DR: Dosis de reposición, DRM: Dosis de reposición más micronutrientes. A. profundidad 0-5 cm. B. Profundidad 5-10 cm. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de la misma profundidad (MLGM, Test DGC 5%).

Figure 3. Species diversity (Shannon-Wiener index) obtained by amplification of the 16S rRNA gene and DGGE from soil samples with different fertilization plots: T: control without fertilization, DP: Farmer rate, DR: Replacement rate, DRM: Replacement rate + micronutrients. A. Depth 0-5 cm. B. Depth 5-10 cm. Different letters indicate statistically significant differences between plots of the same depth (MLGM, DGC Test 5%).

riana del suelo ha sido reportado por Marschner *et al.* (2003). Del mismo modo, Ge *et al.* (2008) observaron que la riqueza y diversidad de bacterias disminuyó en tratamientos con fertilización mineral nitrogenada en comparación con la aplicación de enmiendas y fertilización sin N. Esta disminución se asocia a que la fertilización disminuye el pH del suelo y las bacterias se desarrollan mejor en pH cercanos a la neutralidad (Fierer, 2017). En este estudio el efecto del pH del suelo sobre la comunidad de bacterias fue evidenciado por el análisis de correlación de Pearson. Se observó una correlación altamente positiva y significativa entre el pH y la riqueza (Pearson, 0-5cm: $r_2=0,27$, $p<0,05$; 5-10cm: $r_2=0,90$, $p<0,01$), y el pH y la diversidad (Pearson, 0-5cm: $r_2=0,30$, $p<0,05$; 5-10cm: $r_2=0,91$, $p<0,01$). Similares resultados fueron reportados por Lauber *et al.* (2009) quienes luego de realizar pirosecuenciación de 88 suelos, observaron que la diversidad filogenética de las comunidades bacterianas se correlacionó con el pH del suelo ($R^2= 0,50$), con picos de diversidad en suelos con pH cercanos a la neutralidad.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la composición de las comunidades de 0-5 cm vs 5-10 cm (permanova, $R=0,52$; $p<0,01$), y entre tratamientos de fertilización (permanova, $R=0,21$; $p<0,01$). La relación entre la composición de la comunidad microbiana, el pH y las variables de funcionalidad microbiana se representan en la **Figura 4A y B**. Las comunidades bacterianas del suelo en T y DP presentaron mayor similitud entre sí que con los tratamientos de altas dosis de fertilización (i.e. DR y DRM) para ambas profundidades (0-5 cm: permanova, $r=0,20$; $p<0,007$; 5-10 cm: permanova, $r=0,43$; $p<0,001$) (**Figura 4A y B**). En los primeros 5 cm, las actividades enzimáticas, glomalinas, pH y NAN se correlacionaron con la composición de las comunidades microbianas tal como se observa en la **Figura 4A**) a través de los vectores cuya dirección y longitud representan el sentido y significancia de la correlación, respectivamente (envfit, $p<0,05$). La comunidad bacteriana de los tratamientos de menor fertilización (T y DP) correlacionó con pH, NAN y actividad de ureasa (**Figura 4A**, en-

vfit $p<0,05$), mientras que ante mayores dosis de fertilización (i.e. DR y DRM), correlacionó con actividad de fosfatasa y contenido de glomalinas (**Figura 4A**, envfit $p<0,05$). Podría inferirse que frente a limitaciones nutricionales presentes en T y DP, se incrementaron las funciones relacionadas al ciclo del nitrógeno, el principal macronutriente requerido por los cultivos. En las situaciones de mayor fertilización, en cambio, las alteraciones de las propiedades químicas del suelo, favorecieron aquellos procesos que demandan bajos valores de pH, como es el caso de las fosfatasas ácidas. Finalmente, en la profundidad 5-10 cm, la composición de la comunidad bacteriana solo correlacionó con pH (envfit, $p<0,05$) (**Figura 4B**). Los tratamientos que presentaron mayor acidificación (DR y DRM) mantuvieron su efecto sobre las comunidades microbianas en la capa sub-superficial del suelo. Nuestros resultados demuestran que las bacterias son sensibles a la acidificación del suelo producto del uso prolongado de fertilizantes y que los efectos negativos se manifiestan tanto en los primeros cm como en la capa sub-superficial de 5-10 cm. Sin embargo, aunque el pH constituye el mejor predictor de la composición de las comunidades bacterianas del suelo (Fierer, 2017), no todas las especies responden iguales. Es decir, mientras algunas son muy sensibles a los cambios de pH, otras son cosmopolitas y se adaptan a un gran rango de condiciones (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018). Por ejemplo, Rousk *et al.* (2010) observaron predominio de *acidobacterias* en pH más bajos y *nitrospira*, α -, β -, y δ -*Proteobacteria* en pH más altos. Por su parte, Bocolini *et al.* (2016) observaron que la diversidad de bacterias oxidantes de amoníaco aumentó en los sitios de mayor fertilización que a su vez tuvieron una disminución significativa en los valores de pH.

CONCLUSIONES

Para los primeros 5 cm, la fertilización afectó la estructura de la comunidad bacteriana observándose cambios en la composición de las comunidades. También afectó la funcionalidad, con aumentos en las fosfatasas y glomalinas y disminución de actividad ureasa y NAN ante incrementos de las dosis de fertilización.

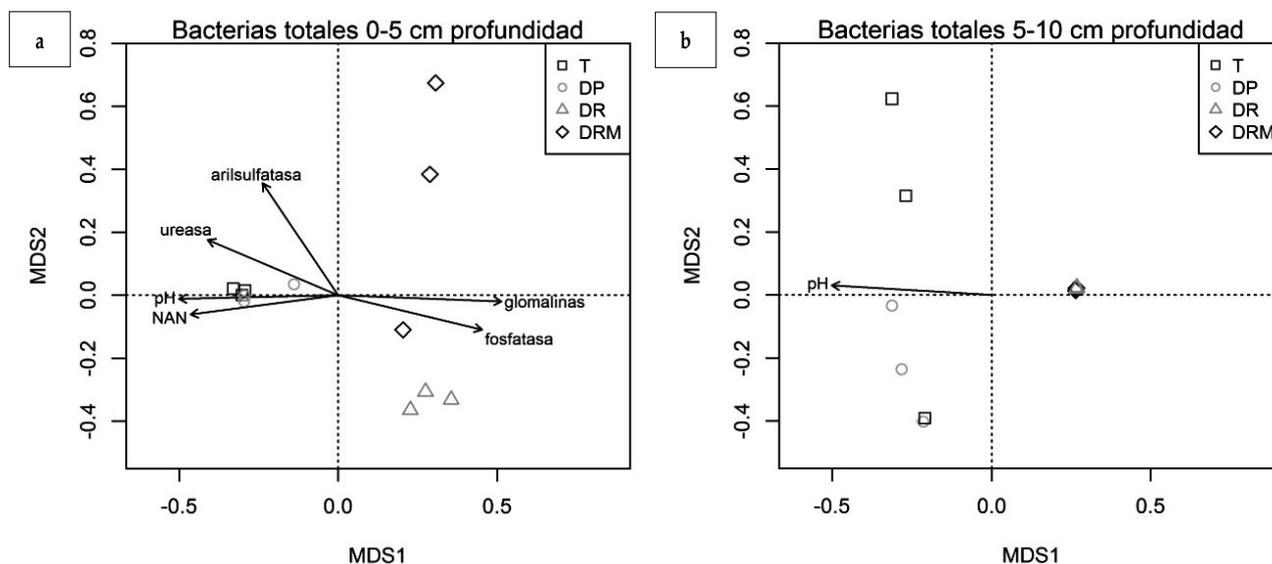


Figura 4. Análisis de composición de comunidades bacterianas (PCO) obtenidas mediante amplificación de gen 16S rRNA y DGGE a partir de muestras de suelo con diferentes tratamientos de fertilización: T: testigo sin fertilización, DP: Dosis de productor, DR: Dosis de reposición, DRM: Dosis de reposición más micronutrientes. A. Profundidad 0-5 cm. B. Profundidad 5-10 cm. Los vectores representan correlaciones lineales estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las comunidades bacterianas y actividad enzimática, NAN, glomalinas y pH. La dirección del vector indica el sentido del gradiente y su longitud representa la significancia estadística.

Figura 4. Analysis of composition of bacterial communities (PCO) obtained by amplification of 16S rRNA gene and DGGE from soil samples with different fertilization treatments: T: control without fertilization, DP: Farmer rate, DR: Replacement rate, DRM: Replacement rate + micronutrients. A. Depth 0-5 cm. B. Depth 5-10 cm. The vectors represent statistically significant linear correlations ($p < 0,05$) between bacterial communities and enzymatic activity, NAN and glomalin. The direction of the vector indicates the direction of the gradient and its length represents the statistical significance.

En la capa sub-superficial (5-10cm), en cambio, la fertilización no sólo generó cambios en la composición de la comunidad bacteriana del suelo sino que también se observaron reducciones significativas de la riqueza y diversidad frente a dosis de reposición de nutrientes (DR y DRM). En términos generales, aunque la funcionalidad biológica fue menor, hubo respuesta a la fertilización registrándose elevados valores de glomalinas y arilsulfatasa en alta dosis de fertilización; y de NAN en ausencia de fertilización.

Tales diferencias estuvieron asociadas a los efectos de la fertilización sobre el pH del suelo debido al historial de 16 años ininterrumpidos de aplicación de fertilizantes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) a través de los proyectos PNCYO 1127032, PNCYO 1127033 y CORDO 1262101; y también por

el Instituto Internacional de Nutrición de Plantas (IPNI), la Asociación Argentina de Productores en Siembra directa (AAPRESID) y Nutrien Ag Solutions.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, G & H Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol Biochem* 33(7-8): 943-951.
- Ajwa, HA; C Dell & CW Rice. 1999. Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. *Soil Biol Biochem* 31(5): 769-777.
- Boccolini, MF; LA Basile; CR Cazorla; C Galarza; B Conde & ELM Figuerola. 2016. Impacto de la aplicación prolongada de urea sobre bacterias nitrificantes de un Argiudol típico, Argentina. *Ciencia del suelo* 34 (1): 21-31.
- Chakraborty, A; K Chakrabarti; A Chakraborty & S Ghosh. 2011. Effect of long-term fertilizers and manure application on microbial biomass and microbial activity of a tropical agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* 47(2): 227-233.

- Correa, 2016. La fertilización y las comunidades microbianas indígenas de los suelos. En: AACS (ed.). Sustentabilidad de agrosistemas y el uso de fertilizantes. . Vol. 1. 1era edn Pp. 141-167.
- Dai, J; J Hu; A Zhu & X Lin. 2017. No-tillage with half amount residue retention enhances microbial functional diversity, enzyme activity and glomalin-related soil protein content within soil aggregates. *Soil Use Manag* 33(1): 153-162.
- DeForest, JL; KA Smemo; DJ Burke; HL Elliott & JC Becker. 2012. Soil microbial responses to elevated phosphorus and pH in acidic temperate deciduous forests. *Biogeochemistry* 109 (1-3): 189-202.
- Delgado-Baquerizo, M; AM Oliverio; TE Brewer; A Benavent-González; DJ Eldridge; RD Bardgett & N Fierer. 2018. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* 359 (6373): 320-325.
- Di Rienzo, JA; F Casanoves; MG Balzarini; L Gonzalez; M Tablada & CW Robledo. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. En: <http://www.infostat.com.ar>.
- Dick, RP. 1992. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 40(1-4): 25-36.
- Dick, WA; L Cheng & P Wang. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biol Biochem* 32(13): 1915-1919.
- Echeverría, HE & FO García. 2014. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. Ediciones INTA. 904 pp.
- Echeverría, HE; N San Martín & R Bergonzi. 2000. Métodos rápidos de estimación del nitrógeno potencialmente mineralizable en suelos. *Ciencia del Suelo* 18(1): 9-16.
- Ferreras, L; S Toresani; B Bonel; E Fernández; S Bacigalupo; V Faggioli & C Beltrán. 2009. Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos. *Ciencia del suelo*, 27(3): 103-114.
- Fertilizar. 2016. Consumo de Fertilizante de todos los cultivos. En: <http://www.fertilizar.org.ar/>.
- Fierer, N. 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10): 579-590.
- Frey, SD. 2007. Spatial distribution of soil organisms. En: EA Paul. (ed.). *Soil microbiology, Ecology and Biochemistry*. Vol. 1. 3ra edn Pp 283-300. Academic Press. Oxford. 552 pp.
- Galantini, JA; J Iglesias; M Landriscini; L Suñer & G Minoldo. 2008. Calidad y dinámica de las fracciones orgánicas en sistemas naturales y cultivados. En: Galantini, JA. Vol. 1. 1ra edn Pp. 71-95. Universidad Nacional del Sur.
- Ge, Y; JB Zhang; LM Zhang; M Yang & JZ He. 2008. Long-term Fertilization Regimes Affect Bacterial Community Structure and Diversity of an Agricultural Soil in Northern China. *J Soils Sediments* 8 (1): 43-50.
- Geisseler, D & KM Scott. 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms—A review. *Soil Biol Biochem* 75: 54-63.
- Gudelj V; H Ghio; O Gudelj; C Lorenzon; MB Conde; JP Ioele; C Galarza; P Vallone; P Tamburrini & F García. 2017. Evaluación de reposición de nutrientes en experimentos de larga duración del Sudeste de Córdoba. En: Salvagioti, F; H Krüger & G Studdert. *Ensayos de Larga Duración en Argentina: Un aporte al logro de Sistemas Agrícolas Sustentables*. Vol. 1. 1ra edn Pp. 115-144. Ediciones INTA. 386 pp.
- Hirsch, PR. 2019. Microorganisms cycling soil nutrients. Capítulo 11. Pp. 179-195. In: van Elsas, JD; JT Trevors; JK Soares Rosado & P Nannipieri. (Eds). *Modern soil microbiology*. Third Edition. CRC Press. Boca Raton. USA. 472 pp.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 1985. Carta de suelos de la República Argentina. Hoja 3363 – 23. Corral de Bustos.
- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) 1999. Norma 29 410. Determinación del pH.
- Jun, N; ZH Jian-Min; W Huo-Yan; C Xiao-Qin & DU Chang-Wen. 2007. Effect of Long-Term Rice Straw Return on Soil Glomalin, Carbon and Nitrogen. *Pedosph* 17(3): 295-302.
- Kuzyakov, Y; JK Friedel & K Stahr. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol Biochem* 32(11-12): 1485-1498.
- Lauber, CL; M Hamady; R Knight & N Fierer. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* 75(15): 5111-5120.
- Liang, Q; H Chen; Y Gong; H Yang; M Fan & Y Kuzyakov. 2014. Effects of 15 years of manure and mineral fertilizers on enzyme activities in particle-size fractions in a North China Plain soil. *European Journal of Soil Biology*, 60: 112-119
- Marschner, P; E Kandeler & B Marschner. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol Biochem* 35(3): 453-461.
- Menhinick, EF. 1964. A Comparison of some Species-Individuals Diversity Indices Applied to Samples of Field Insects. *Ecology* 45 (4): 859-861.
- Morales, D; MM Vargas; MPD Oliveira; BL Taffe; J Comin; CR Soares & P Lovato. 2016. Response of soil microbio-

- ta to nine-year application of swine manure and urea. *Ciência Rural* 46(2): 260-266.
- Muyzer, G; EC De Waal & AG Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by DGGE analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl env micr* 59(3): 695-700.
- Nannipieri, P; J Ascher; MT Ceccherini; L Landi; G Pietramellara & G Renella 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655-670.
- R Development Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing.
- Prietzl, J. 2001. Arylsulfatase activities in soils of the Black Forest/Germany—seasonal variation and effect of (NH₄)₂SO₄ fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(10): 1317-1328.
- Rillig, MC. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, 84(4): 355-363.
- Rillig, MC; SF Wright; KA Nichols; WF Schmidt & MS Torn. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil* 233(2): 167-177.
- Rousk, J; E Bååth; PC Brookes; CL Lauber; C Lozupone; JG Caporaso; R Knight & N Fierer. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal* 4(10): 1340-1351.
- Salvagiotti, F; DJ Collino; A Perticari; C Piccinetti; G Ovando; S Urquiaga & RW Racca. 2015. El aporte de la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja en Argentina. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica*.
- Shannon, CE. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 27, 379-423.
- Soares Rosado, A; P Nannipieri & JD van Elsas. 2019. Management strategies for soil used for cultivation, including modulation of the soil microbiome. Pp 431-459. En: van Elsas, JD; JT Trevors; JK Soares Rosado & P Nannipieri (Eds). *Modern soil microbiology*. Third Edition. CRC Press. Boca Raton. USA. 472 pp.
- Tabatabai MA & JM Bremner. 1969. Phosphatase activity. In: K Alef & P Nannipieri. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Vol. 1. 1ra edn Pp. 335-344. Academic Press Inc. London. 860 pp.
- Tabatabai MA & JM Bremner. 1972. Urease activity. En: K Alef & P Nannipieri. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Vol. 1. 1ra edn Pp. 316-320. Academic Press Inc. London. 860 pp.
- Tabatabai MA & JM Bremner. 1970. Arylsulfatase activity. En: K Alef & P Nannipieri. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Vol. 1. 1ra edn Pp. 364-365. Academic Press Inc. London. 860 pp.
- van Elsas, JD; JT Trevors; JK Soares Rosado & Nannipieri, P. 2019. *Modern soil microbiology*. Third Edition. CRC Press. Boca Raton. USA. 472 pp.
- Wallace, A. 1994. Soil acidification from use of too much fertilizer. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25(1-2): 87-92.
- Wright, SF & A Upadhyaya. 1999. Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza* 8(5): 283-285.
- Wu, F; M Dong; Y Liu; X Ma; L An; JP Young & H Feng. 2011. Effects of long-term fertilization on AM fungal community structure and Glomalin-related soil protein in the Loess Plateau of China. *Plant soil* 342(1-2): 233-247.
- Zhalnina, K; R Dias; PD de Quadros; A Davis-Richardson; FA Camargo; IM Clark & Triplett, E. W. 2015. Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microbial ecology*, 69(2): 395-406.