



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Dinámica de poblaciones bacterianas durante la descomposición de materia orgánica
en suelo sometido a diferentes prácticas agrícolas**

TESIS

Que presenta

M. en C. Yosef Amin Chávez Romero

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de tesis: Dr. Luc Dendooven

Codirector de tesis: Dra. Yendi E. Navarro Noya

Ciudad de México

Abril de 2016

Agradecimientos

Índice

Contenido	página
Introducción	7
<i>El papel ecológico de las bacterias y el reto de la ecología microbiana</i>	7
<i>La agricultura tradicional y la agricultura de conservación</i>	8
<i>Efecto de las prácticas agrícolas sobre las características fisicoquímicas y las comunidades bacterianas del suelo</i>	9
Justificación	11
Hipótesis	11
Objetivo general	11
Objetivos particulares	12
Estrategia experimental	12
<i>Origen geográfico de las muestras de suelo</i>	12
<i>Toma de la muestra y análisis fisicoquímico del suelo</i>	15
<i>Incubación aeróbica para la dinámica de mineralización</i>	16
<i>Extracción de DNA y amplificación por PCR de un fragmento de la región que codifica para el rRNA 16S</i>	18
<i>Análisis de la comunidad bacteriana del suelo</i>	19
Resultados	21
<i>Características fisicoquímicas del suelo</i>	21
<i>Estructura de la comunidad bacteriana en el suelo de los diferentes tratamientos en campo</i>	23
<i>Emisiones de CO₂ y evolución del nitrógeno mineral</i>	34
<i>Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en el suelo adicionado con residuos de plantas de trigo</i>	36
Discusión de los resultados	40
<i>Características fisicoquímicas del suelo</i>	40
<i>Efecto de las prácticas agrícolas sobre la estructura de la comunidad bacteriana</i>	41
<i>Efecto de la adición de materia orgánica sobre la comunidad bacteriana</i>	43
Conclusión	46
Recomendaciones	47
Perspectivas	49
Literatura citada	50

Índice de tablas y figuras

Contenido	página
Tablas	
1. Características fisicoquímicas del suelo	22
2. Parámetros de diversidad alfa	23
3. Grupos bacterianos afectados por las prácticas agrícolas	26
4. Grupos bacterianos afectados por la aplicación de fertilizante	31
5. Análisis perMANOVA basado en la matriz de distancias pareadas UniFrac para comparar las diferencias en las poblaciones bacterianas entre las muestras de suelo, los tratamientos y el tiempo de incubación.	32
6. Correlación entre las características del suelo y la abundancia relativa de los fila bacterianos encontrados en el suelo sin residuos de trigo	32
7. Grupos bacterianos cuya abundancia relativa disminuye significativamente por la adición de residuos de plantas de trigo con respecto al control	38
8. Grupos bacterianos cuya abundancia relativa aumenta significativamente por la adición de residuos de plantas de trigo con respecto al control	39
Figuras	
1. Distribución de las parcelas en campo	13
2. Esquema del procedimiento para la toma de muestras de suelo	16
3. Análisis de componentes principales considerando la abundancia relativa de los fila encontrados en los tratamientos agrícolas sin fertilizar	28
4. Análisis de componentes principales considerando la abundancia relativa de los fila encontrados en los tratamientos agrícolas fertilizados	29
5. Análisis de correlación canónica considerando la abundancia relativa de los diferentes fila bacterianos y las características fisicoquímicas de los seis distintos tratamientos agrícolas	33
6. Emisión de CO ₂ y nitrógeno mineral	35
7. Análisis de componentes principales considerando la abundancia relativa de los diferentes fila en el suelo fertilizado y no fertilizado, con y sin residuos de trigo	37

Resumen

El presente trabajo ofrece evidencia del efecto de las prácticas agrícolas como la quema, retención e incorporación de rastrojo en campo y de la fertilización con nitrógeno (300 kg N ha^{-1}) sobre las comunidades bacterianas durante el proceso de descomposición de materia orgánica. La hipótesis de este trabajo es que bajo cada tratamiento agrícola la diversidad y abundancia de grupos bacterianos se modifica debido a la adaptación microbiana a características fisicoquímicas específicas, entonces también habrá diferencias en las poblaciones bacterianas involucradas en la descomposición de materia orgánica. Dichas diferencias podrían proveer información sobre la sustentabilidad de las prácticas.

Para ello, se evaluó la mineralización de plantas de trigo jóvenes y secas durante 56 días en incubación aeróbica con suelo proveniente de parcelas experimentales sometidas a tres distintas prácticas agrícolas (quema, retención e incorporación de rastrojo) dedicadas al cultivo de maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) en rotación. Como control se utilizó suelo incubado sin la adición de residuos vegetales. Se determinaron algunas características fisicoquímicas del suelo y se midió la evolución de la emisión de CO_2 y nitrógeno inorgánico durante la incubación bajo cada tratamiento. Se determinaron la diversidad y composición de las comunidades bacterianas mediante la secuenciación y análisis del fragmento V1-V3 del rDNA 16S amplificado a partir el DNA metagenómico del suelo.

Los resultados mostraron que la retención de rastrojo incrementa el contenido de carbono orgánico, mientras que la quema no sólo evita el secuestro de carbono sino que alcaliniza el suelo e incrementa la conductividad electrolítica. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la capacidad de mineralización entre los diferentes tratamientos agrícolas.

En el caso del suelo sin la adición de residuos vegetales, se encontró un efecto significativo sobre los grupos bacterianos debido al contenido de carbono orgánico, a la fertilización con nitrógeno (especialmente sobre el género *Nitrosovibrio*) y al manejo de rastrojo en campo. Es decir, que estos factores definieron la estructura de la comunidad bacteriana. En el caso del suelo adicionado con residuos vegetales estos factores fueron menos determinantes. Estas observaciones refuerzan la hipótesis planteada y brindan información adicional sobre el efecto de la adición de residuos vegetales (al suelo) en las prácticas agrícolas.

Los residuos de plantas de trigo incrementaron la abundancia relativa de los filo Actinobacteria y Firmicutes, pero disminuyeron la abundancia de un buen número de filo. Los géneros favorecidos fueron *Promicromonospora*, *Bacillus*, *Agromyces*, *Streptomyces*, *Sinorhizobium* y *Lysobacter*, lo cual sugiere que estos grupos son los principales involucrados en la degradación de los residuos de trigo (estrategas *r*). Las diferencias entre los grupos encontrados en cada tratamiento indicaron que el manejo de rastrojo también define la estructura de la comunidad aunque en menor grado.

Palabras clave: Descomposición de materia orgánica; estrategias *K* y *r*; poblaciones bacterianas del suelo.

Abstract

The aim of this study was to provide evidence on the effect of agricultural practices, as burning, retention and incorporation of stubble in the field, and nitrogen fertilization (300 kg N ha⁻¹), on the bacterial communities during the decomposition of organic matter. The hypothesis of this study is that each agricultural treatment exhibits specific diversity and abundance of bacterial groups due to microbial adaptation to specific physicochemical characteristics. These differences could provide information on sustainability of practices.

The mineralization of dried young wheat plants for 56 days in aerobic incubation in soil from experimental plots subjected to three different treatments (burning, retention, and incorporation of stubble) cultivated with corn (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) in rotation was studied. Unamended soil served as control. Soil was characterized, and the evolution of CO₂ and inorganic nitrogen was measured during the incubation. Diversity and compositions of the bacterial communities was determined through the sequencing and bioinformatic analysis of the V1-V3 16S rDNA fragments from metagenomic DNA of soil under the different treatments.

Our results show that stubble retention in soil increases the organic carbon content, while burning avoid carbon sequestration and increases alkalinity of soil and electrolyte conductivity. However, no differences in mineralization ability between different agricultural treatments were observed.

Significant effect in soil without wheat residue addition was found on the bacterial groups due to the organic carbon content, nitrogen fertilization (especially on the *Nitrosovibrio* genus), and stubble management. This means that these factors define the structure of the bacterial communities. In the wheat amended soil those factors were less determinant. These observations strengthen the hypothesis and provide additional information on the effect of the addition of plant residues.

Wheat plant residues increased relative abundance of Firmicutes and Actinobacteria phyla but decreased the abundance of several other groups. *Promicromonospora*, *Bacillus*, *Agromyces*, *Streptomyces*, *Sinorhizobium* and *Lysobacter* were the most favored genera suggesting that these groups are primarily involved in the degradation of wheat plants (*r* strategists). Differences between treatment groups found in each management indicate that stubble management also defines the community structure but in lesser degree.

Keywords: Organic matter decomposition; *K* and *r* strategists; Soil bacterial populations.

Introducción

El papel ecológico de las bacterias y el reto de la ecología microbiana

Los procariotas son el grupo de organismos más diverso y abundante sobre la tierra y habitan prácticamente en todos los ambientes, especialmente en el suelo (Rappé y Giovannoni, 2003; Curtis y Sloan, 2005; Roesch et al., 2007). Su papel ecológico a nivel global abarca los ciclos biogeoquímicos, el reciclaje de materia orgánica, la liberación de nutrientes y emisión de gases atmosféricos como dióxido de carbono, metano y óxido nitroso (Nannipieri et al., 2003; Tellez-Rio et al., 2015).

Se ha puesto especial interés en el estudio de los procesos biogeoquímicos, y de los microorganismos y las rutas metabólicas implicadas en dichos procesos (Schlesinger, 2000). Sin embargo, la caracterización de las comunidades microbianas en el medio ambiente es complicada debido a que 1) existe una extrema riqueza de especies con una elevada variabilidad de distribución a pequeña escala, y a 2) que más del 95% de las bacterias no pueden ser cultivadas para su aislamiento y caracterización por los métodos tradicionales (Rosch y Bothe, 2005). Las comunidades microbianas son un complejo ensamblaje de especies con diferentes características metabólicas y requerimientos fisiológicos, y cada una dirige al menos una de múltiples reacciones en el proceso de transformación de la materia orgánica. En este contexto, el mayor reto de la ecología microbiana precisa la identificación de las poblaciones microbianas y su función en la degradación de distintas fuentes de carbono, así como el efecto de perturbaciones naturales y antropogénicas sobre la estructura y función de las comunidades bacterianas del suelo (Bernard et al., 2007).

La agricultura tradicional y la agricultura de conservación

La creciente demanda de productos del campo ha traído como consecuencia la deforestación de los ecosistemas para ser empleados en la agricultura (Gibbs et al., 2010). Ramankutty et al. (2008) calcularon que cerca del 40% de la superficie terrestre era empleada para la agricultura. El objetivo es alcanzar cada vez mayores rendimientos en el menor tiempo posible con una menor dependencia del clima. Para alcanzar este objetivo tradicionalmente se emplean máquinas para arar, sembrar y cosechar, herbicidas, plaguicidas, fertilizantes y una serie de prácticas para remover el rastrojo, que en conjunto provocan el deterioro ecológico del suelo, el ambiente y la pérdida de biodiversidad (Tschamtkke, 2005).

En contraparte, la agricultura de conservación (AC) se basa en tres principios 1) la mínima o cero labranza, 2) la retención de rastrojo en el suelo y 3) la rotación de cultivos. Estas prácticas han demostrado tener efectos benéficos en el suelo, por ejemplo, incrementan el contenido de materia orgánica, mejoran la estructura, previenen la erosión, incrementan la humedad y la fertilidad, etc. (Govaerts et al., 2009). Así, la agricultura de conservación se propone como una alternativa sustentable para conservar y recuperar suelos impactados por la agricultura tradicional (Hobbs et al., 2008).

Efecto de las prácticas agrícolas sobre las características fisicoquímicas y las comunidades bacterianas del suelo

Posiblemente, la práctica tradicional que más afecta al suelo agrícola es la labranza, porque rompe los agregados, deteriora la estructura, favorece la erosión, y el uso de máquinas provoca la compactación del suelo (Hartmann et al., 2014). En consecuencia, la textura, y la capacidad de retención de agua que dependen de la textura, pueden cambiar. La eliminación de residuos agrícolas que quedan sobre el campo tras la cosecha es una práctica común. Al evitar la entrada de materia orgánica nueva al suelo, el contenido de carbono orgánico disminuye gradualmente y, a la larga, la fertilidad se pierde (Hamza y Anderson, 2005). La labranza convencional aunada a la remoción de rastrojo propicia la erosión porque el suelo queda totalmente descubierto y la pérdida de humedad es más rápida (Ehigiator y Anyata, 2011). El deterioro del suelo provoca la pérdida de biodiversidad (Rey y Bullock, 2012) y contribuye al cambio climático (Bajželj, 2014).

Los efectos ecológicos de la agricultura tradicional han promovido el desarrollo de alternativas más sustentables, como la agricultura de conservación (AC) basada en tres prácticas que son la rotación de cultivos, la labranza mínima y la retención de rastrojo en el campo (Govaerts et al., 2009). Esta variante de la agricultura ha mostrado tener beneficios en el rendimiento de la producción, reducir el impacto ecológico y ayudar a recuperar la calidad de suelos agrícolas deteriorados (Verhulst et al., 2011).

Las prácticas agrícolas como la labranza (Raiesi y Behesthi, 2015), el manejo de rastrojo en campo (Obade y Lal, 2014) y la aplicación de fertilizantes inorgánicos (Chaudhry et al., 2012), cambian las características fisicoquímicas del suelo como el pH (Tripathi et al., 2012), la conductividad electrolítica (EC) (Rezapour et al., 2013) y el contenido de materia orgánica (Sul et al., 2013; Li et al., 2014). Adicionalmente, la labranza y el manejo de rastrojo en el campo

modifican la estructura de las comunidades bacterianas (Carbonetto et al., 2014). Por ejemplo, Navarro-Noya et al. (2013) encontraron que la labranza incrementaba la abundancia relativa de los filo Actinobacteria y Betaproteobacteria, pero disminuía la de Gammaproteobacteria, mientras que, la incorporación y retención de rastrojo tenían un efecto positivo sobre la abundancia relativa de Bacteroidetes y Betaproteobacteria y un efecto negativo sobre Cyanobacteria y Gemmatimonadetes.

Ramírez-Villanueva et al. (2015) encontraron que la agricultura de conservación, en el campo experimental de El Batán (Texcoco, Estado de México), favorece a las bacterias oligotróficas Acidobacteria, Planctomycetes y Verrucomicrobia, mientras que la agricultura tradicional favorece a las bacterias que metabolizan la fracción de la materia orgánica de fácil descomposición, como Actinobacteria. Esto sucede porque en la agricultura convencional la labranza mezcla el suelo y rompe los agregados haciendo más accesible la materia orgánica para los microorganismos (Powlson et al., 2012).

Justificación

Las bacterias son importantes para la fertilidad del suelo, este hecho es especialmente relevante en los campos agrícolas. Aunque es claro que las prácticas agronómicas definen la estructura de la comunidad bacteriana, hace falta información sobre cómo el manejo de residuos o la fertilización con nitrógeno, determinan dicha estructura durante la degradación de material vegetal fresco y del efecto que tendrían estas prácticas sobre el proceso de mineralización de los residuos.

Hipótesis

La quema, retención y remoción de rastrojo definirán la estructura de las comunidades bacterianas. Los grupos de degradadores primarios: Actinobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes y Proteobacteria incrementaran su abundancia debido a la adición de materia orgánica fresca al suelo.

Objetivo general

Estudiar los cambios en las comunidades bacterianas del suelo por efecto del manejo de rastrojo en campo (retención, quema e incorporación de residuos) y fertilización con nitrógeno (300 kg N ha⁻¹), durante el proceso de mineralización de la materia orgánica.

Objetivos particulares

Determinar y comparar la composición y estructura de las comunidades bacterianas del suelo sometido a diferente manejo de rastrojo en campo (retención, quema e incorporación de residuos) y fertilización con nitrógeno.

Determinar la correlación entre la aplicación de las diferentes prácticas agrícolas, los cambios de las características fisicoquímicas del suelo y la estructura de las comunidades bacterianas.

Determinar los cambios en composición y estructura de las comunidades bacterianas del suelo sometido a diferentes prácticas agrícolas durante una dinámica de degradación de materia orgánica.

Estrategia experimental

Origen geográfico de las muestras de suelo

El suelo fue colectado en el campo experimental Norman E. Borlaug (CENEB) perteneciente al Centro de Investigación y Mejoramiento para el Maíz y Trigo (CIMMYT), cerca de Ciudad Obregón, Sonora, México (lat. 27.33° N, long. 109.09° W, 38 m.s.n.m.). El clima en el campo experimental es árido con 320 mm anuales de lluvia y una tasa de evapotranspiración de 1800 a 2000 mm (Verhulst et al., 2011). Entre los años 1986 y 2009 la precipitación anual fue de entre 90 y 590 mm lo que demuestra la gran variabilidad del sitio. La lluvia ocurre principalmente en verano y sólo el 20 % de la precipitación promedio anual ocurre durante la temporada de crecimiento del trigo (Noviembre-Mayo). La temperatura media anual es de 24 °C, la temperatura mensual varía desde 16.3 °C en Enero hasta 30.8 °C en Julio/Agosto. El suelo

se clasifica como un Vertisol hiposódico (calcáreo, crómico) de acuerdo a la base referencial mundial del recurso del suelo (Verhulst et al., 2009; IUSS Working Group, 2007) y como un Haplotorret esmectítico crómico fino por el Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos (Verhulst et al., 2009; Soil Survey Staff, 2003). Las parcelas de donde se tomó el suelo pertenecen a un experimento a largo plazo comenzado en 1992, que consiste de varios tratamientos con un diseño de bloques al azar con parcelas divididas y tres réplicas por tratamiento (Verhulst et al., 2011) (Figura 1). Las parcelas fueron tratadas con diferentes formas de manejo de rastrojo postcosecha, ya sea con o sin urea como fertilizante nitrogenado.

147	113	151	132	124	256	233	241	227	213	326	315	341	335	354
145	114	153	134	121	255	234	246	223	214	321	316	343	333	357
143	115	152	136	127	253	236	242	221	217	323	312	347	336	353
141	117	156	133	125	251	232	245	226	215	327	313	345	331	356
146	112	157	131	122	254	237	243	224	212	322	314	344	337	355
142	116	154	135	126	252	231	247	225	216	325	311	342	334	352
144	111	155	137	123	257	235	244	222	211	324	317	346	332	351
Réplica 1					Réplica 2					Réplica 3				

Figura 1. Esquema del terreno de siembra y distribución de las parcelas en el Campo Experimental Norman E. Borlaug (CENEB) en Ciudad Obregón, Sonora, México. Los cuadros en gris corresponden a las seis parcelas muestreadas (tres diferentes manejos de rastrojo con y sin fertilizante nitrogenado) por triplicado.

Para el presente estudio se seleccionaron tres prácticas distintas de manejo de rastrojo (tres parcelas con tres réplicas cada una) con dos regímenes de fertilización (0 y 300 kg ha⁻¹ de N en forma de Urea):

1. Tratamiento **CTB**: parcela con labranza convencional, las camas son labradas después de cada cosecha con una rastra de disco a una profundidad de 20 cm, los residuos de maíz y trigo son incorporados mediante la operación de labranza, los cultivos no son fertilizados.
2. Tratamiento **CTBN**: mismo manejo de rastrojo y labranza que en CTB pero los cultivos son fertilizados con 300 kg de nitrógeno por hectárea.
3. Tratamiento **PBB**: camas elevadas permanentes, sin labranza y continuo reúso de las camas, los surcos se reforman sin perturbar las camas, los residuos del maíz y trigo son quemados y no se aplica fertilizante.
4. Tratamiento **PBBN**: mismo manejo de rastrojo y labranza que en PBB pero los cultivos son fertilizados con 300 kg de nitrógeno por hectárea.
5. Tratamiento **PBR**: camas elevadas permanentes, sin labranza y continuo reúso de las camas, los surcos se reforman sin perturbar las camas, los residuos del maíz y trigo se dejan sobre la superficie del suelo y no se aplica fertilizante.

6. Tratamiento **PBRN**: mismo manejo de rastrojo y labranza que en PBR pero los cultivos son fertilizados con 300 kg de nitrógeno por hectárea.

El sistema de cultivo es una rotación anual de maíz y trigo con irrigación en los surcos (una irrigación de aproximadamente 120 mm antes de la siembra y cuatro irrigaciones adicionales de 80-100 mm). El trigo es un cultivo de invierno y se siembra a finales de noviembre y principios de diciembre y se cosecha en mayo, seguido del maíz como cultivo de verano, sembrado en junio y cosechado en octubre. El tránsito queda confinado a los surcos y se usan tractores estrechos para todas las operaciones.

Toma de la muestra y análisis fisicoquímico del suelo

De cada parcela se tomaron 20 muestras de suelo (0-20 cm de profundidad) de las camas, las muestras se juntaron en una muestra compuesta. En total se tomaron 18 muestras correspondientes a los seis tratamientos por triplicado (Figura 2). El suelo se secó al aire y se tamizó con un tamaño de poro de 5 mm. De todas las muestras de suelo se determinó la distribución del tamaño de partícula mediante la técnica del hidrómetro descrita por Gee et al. (1986). El carbono orgánico total se determinó con el equipo “analyzer TOC-VCSN” (Shimadzu, Canby, USA). El nitrógeno total se determinó mediante el método de Kjeldahl usando H₂SO₄ concentrado, K₂SO₄ y HgO para digerir la muestra (Bremner, 1996). La capacidad de retención de agua (CRA) se determinó mediante la resta del peso de una cantidad determinada de suelo seco de la misma muestra saturada con agua y filtrada toda la noche. La conductividad electrolítica (CE) se determinó a partir de un extracto acuoso saturado de la

muestra de suelo tal como lo describe Rhoades et al. (1989) y el pH a partir del extracto acuoso centrifugado de una mezcla 1:2.5 suelo-H₂O usando un electrodo de vidrio (Thomas, 1996).

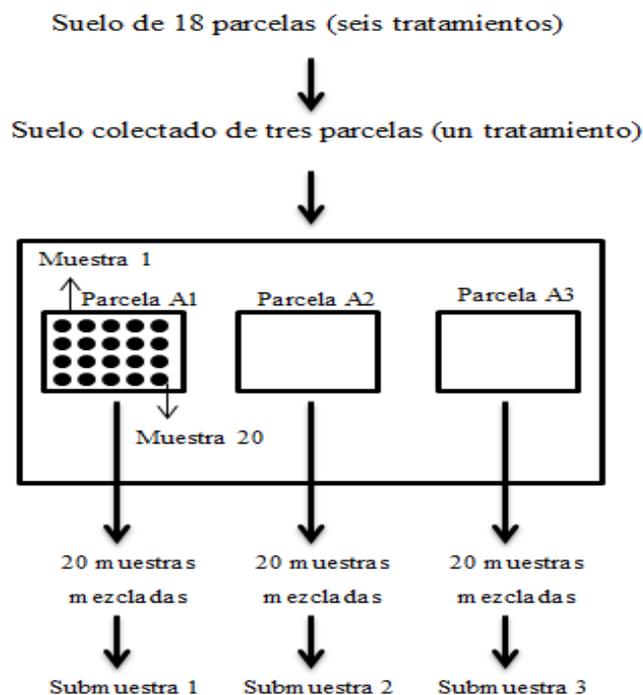


Figura 2. Esquema del procedimiento para la toma de muestras de suelo

Incubación aeróbica para la dinámica de mineralización

Las muestras de suelo ($n = 18$) se hidrataron al 40% de su CRA con agua destilada, se colocaron en barriles separados (Vol.= 50 L) y se preincubaron a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por siete días. En los barriles se colocó un recipiente con un litro de agua destilada para mantener la humedad del suelo y otro con un litro de NaOH 1 M para capturar el CO₂ liberado por el suelo y evitar la saturación del gas. Esta preincubación es necesaria para restablecer los procesos biológicos del suelo (Manzoni et al., 2012), previamente a la dinámica de degradación de residuos vegetales.

Cada unidad experimental consistió de una jarra de vidrio de 1 L sellada herméticamente, dentro de la cual se colocaron tres frascos, uno con 25 g de suelo preincubado (base seca), otro con 20 mL de NaOH 1 M para capturar el CO₂ liberado y uno más con 20 mL de agua destilada para mantener la humedad del suelo. Para la dinámica de mineralización cada tratamiento, es decir, 25 g de suelo preincubado (base seca) se mezcló manualmente con 125 mg de plantas de trigo jóvenes, enteras, secas, finamente molidas en mortero (el equivalente a 2 g de carbono por 1 kg de suelo seco). El control para cada unidad consistió de suelo sin residuos de trigo pero igualmente mezclado.

Para la obtención del material vegetal, se lavaron y desinfectaron semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.), se germinaron en cajas Petri con agar al 0.8 % a 28 °C por 48 h, en obscuridad, después se transfirieron a una cámara de acrílico transparente (6 mm de espesor, 40 x 35 cm de base y 60 cm de altura) con vermiculita y solución Steiner (Steiner, 1961) en condiciones asépticas durante 20 días. Por último, se recuperaron las plantas, se deshidrataron a 60 °C y se molieron finamente en mortero.

Las unidades experimentales se cerraron herméticamente y se incubaron a 22±2 °C durante 56 d en obscuridad. Después de 0, 1, 3, 7, 14, 28 y 56 días se tomaron al azar tres frascos (correspondientes a las réplicas) de cada tratamiento (seis tratamientos, con residuos de trigo), más sus respectivos controles (sin residuos de trigo), es decir 36 frascos en total por cada día de muestreo. El día cero consistió en el último día de la preincubación. Los frascos restantes se airearon por 10 min cada 7 d para evitar anaerobiosis. Por cada día de muestreo se tomó de cada unidad experimental 20 g de suelo, para la determinación de nitrógeno mineral por extracción

sólido-líquido mediante agitación con 80 mL de K₂SO₄ 0.5 M, los restantes 5 g de suelo se guardaron a -20 °C para la extracción de DNA.

Extracción de DNA y amplificación por PCR de un fragmento de la región que codifica para el rRNA 16S

Se emplearon tres técnicas distintas de lisis celular para la extracción de DNA metagenómico (Hofman and Winston, 1987; Sambrook, 2001; Ceja-Navarro et al., 2010). Cada técnica de lisis se realizó tres veces a partir de 0.5 g de suelo, los DNA de las tres extracciones por las tres técnicas se mezclaron, así, se analizaron 4.5 g de suelo de cada unidad experimental para la caracterización por técnicas de biología molecular. Este proceso se realizó para cada una de las muestras de suelo dando un total de 234 muestras de DNA, provenientes de seis tratamientos por triplicado más sus controles (36 unidades experimentales por día de muestreo), por seis días de muestreo (1, 3, 7, 14, 28, 56), más 18 muestras correspondientes al día cero de cada tratamiento por triplicado. Se verificó la pureza y la calidad del DNA metagenómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% revelado con Sybr Gold ® (Invitrogen Carlsbad, CA, USA).

Se amplificó por PCR el fragmento V1-V3 del gen que codifica al rRNA 16S a partir del DNA metagenómico con los iniciadores: 8-F (5'-AGA GTT TGA TCI TGG CTC A-3') y 556-R (5'-TGC CAG IAG CIG CGG TAA-3') (Navarro-Noya et al., 2013). Los iniciadores, además, contenían una etiqueta identificadora de 10 pb y el adaptador correspondiente a la plataforma Roche 454. La mezcla de reacción (25 µL) contenía: regulador de reacción 1 X, 10 mM de cada uno de los cuatro desoxiribonucleótidos-trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 10 pM de cada

iniciador, 1.0 U de *Taq* polimerasa (Thermo Scientific) y 20 ng de DNA metagenómico como molde. El programa de amplificación constó de un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguido de 25 ciclos de amplificación compuestos por un paso de desnaturalización a 95 °C por 45 s, un paso de alineamiento a 53 °C por 45 s y un paso de extensión a 72 °C por 45 s, y por último, un paso final de extensión a 72 °C por 10 min.

Cada muestra se amplificó por cuadruplicado y los productos de amplificación se juntaron en una sola muestra que representó una librería. Cada librería se purificó independientemente con el producto comercial “DNA clean and concentrator purification kit” (Zymo Research, Irvine, CA, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las librerías purificadas se cuantificaron con el fluoroespectrofotómetro NanoDrop™ 3300 (Thermo Scientific NanoDrop) y PicoGreen 2 X (Invitrogen). Por último, grupos de 50 librerías se mezclaron en cantidades equimolares, se purificaron como se describió previamente, y se secuenciaron en la plataforma Roche GS-FLX Titanium 454 pyrosequencer (Roche, Mannheim, Germany) por MacroGen Inc. (DNA Sequencing Service, Seúl, Korea).

Análisis de la comunidad bacteriana del suelo

Las secuencias se procesaron con el software QIIME (<http://www.qiime.org/>) (Caporaso et al., 2010). Brevemente, se eliminaron las secuencias de baja calidad, el ruido de secuenciación se eliminó con el programa Denoiser (Reeder and Knight, 2010). Las secuencias filtradas se usaron para determinar Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs por sus siglas en inglés) a un umbral de 97% de similitud (“Ribotipos” si consideramos que las secuencias son parte del gen que codifica al rRNA) mediante la estrategia de referencia abierta usando Uclust (Edgar, 2010).

Una secuencia representativa de cada OTU fue elegida para hacer la asignación taxonómica con el clasificador RDP (Ribosomal data Project 2.2) con un 80% de confiabilidad (Wang et al., 2007). Se usó como referencia la base de datos Greengenes versión 12_10 (McDonald et al., 2012). Se construyeron matrices biológicas de observación (biom) con las asignaciones taxonómicas y los metadatos (información sobre las muestras de suelo) para los análisis posteriores. La diversidad y los estimadores de riqueza de especies se calcularon a partir de tablas biom rarificadas a 2700 observaciones para eliminar los sesgos debidos a las diferencias en el esfuerzo de muestreo. Las secuencias representativas de cada grupo fueron alineadas al Greengenes core-set-aligned disponible en <http://greengenes.lbl.gov/> con una identidad mínima de 75% usando PyNast (Caporaso et al., 2010). Se construyó un árbol filogenético mediante el modelo de máxima verosimilitud con las secuencias alineadas usando FastTree 2.1.3 (Price et al., 2010). Se generó una matriz de distancias UniFrac usando la información filogenética y los datos de frecuencia para comparar la estructura de las comunidades bacterianas en los diferentes tratamientos. Se realizó un análisis multivariado de varianzas con permutaciones (perMANOVA), usando las distancias pareadas del UniFrac, para probar las diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de las diferentes prácticas agrícolas ($n = 999$). La abundancia de los grupos bacterianos a distinto nivel taxonómico se exploró por separado con un análisis de componentes principales (PCA), usando PROC FACTOR (SAS Institute, 1989). Con un análisis de correlación canónica (CCA) se exploró el grado de relación entre las abundancias de los diferentes grupos bacterianos y las características del suelo. El CCA se hizo con PROC CANCORR en el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1989).

Resultados

Características fisicoquímicas del suelo

El carbono orgánico fue significativamente más alto en los tratamientos de campo con rastrojo retenido PBR y PBRN (en promedio 13.1 g kg⁻¹ suelo seco) comparado con los tratamientos de campo con rastrojo incorporado CTB y CTBN (en promedio 10.5 g kg⁻¹ suelo seco) y los tratamientos de campo con rastrojo quemado PBB y PBBN (en promedio 9.9 g kg⁻¹ suelo seco) ($P < 0.0001$). Mientras que el pH y la conductividad electrolítica (CE) en promedio fueron más altos en los tratamientos de campo PBB y PBBN (8.85 y 1.06 dS m⁻¹ respectivamente) comparado con los tratamientos de campo CTB y CTBN (8.75 y 0.95 dS m⁻¹) y con los tratamientos de campo PBR y PBRN (8.65 y 0.78 dS m⁻¹) ($P < 0.0001$). El contenido de nitrógeno total y los contenidos de arena limo y arcilla no fueron afectados de manera significativa por las prácticas agrícolas (Tabla 1).

Tabla 1. Características fisicoquímicas del suelo afectado por la labranza, el manejo de residuos y la aplicación de nitrógeno en el campo experimental Norman E. Borlaug (CENEB) del CIMMYT cerca de Ciudad Obregón, Sonora, México.

Tratam. ^a	N Fertil. (kg N ha ⁻¹)	pH	CE ^b (dS m ⁻¹)	Total N	Total C	Arcilla	Arena	Limo	Textura clasificación
				————— (g kg ⁻¹ suelo) —————					
CTB	0	8.7 BC	0.86 CB	0.48 A	10.1 B	360 A	380 A	260 A	Limoso-arcilloso
CTBN	300/103	8.8 AB	1.03 AB	0.54 A	10.9 B	390 A	420 A	190 A	Limoso-arcilloso
PBB	0	8.9 A	1.25 A	0.47 A	9.6 B	420 A	390 A	190 A	Arcilloso
PBBN	300/103	8.8 AB	0.87 CB	0.56 A	10.2 B	410 A	400 A	190 A	Arcilloso
PBR	0	8.7 BC	0.77 D	0.50 A	12.9 A	420 A	390 A	190 A	Arcilloso
PBRN	300/103	8.6 C	0.79 CD	0.60 A	13.3 A	400 A	410 A	190 A	Limoso-arcilloso
MSD ^c		0.1	0.24	0.12	1.7	70	80	70	
Valor F		18.75	12.58	2.25	19.23	1.68	0.91	3.07	
Valor P		<0.0001	0.0002	0.1162	<0.0001	0.2136	0.5043	0.0519	

^a Tratamientos, CTB: Todo el rastrojo incorporado mediante labranza convencional después de cada ciclo de cosecha, las camas son reformadas después de cada cosecha, no se aplica fertilizante nitrogenado, CTBN: Igual que el tratamiento anterior pero los cultivos son fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ en el caso del trigo y 103 kg N ha⁻¹ para el maíz, PBB: El rastrojo de maíz y trigo es quemado después de la cosecha, las camas son reformadas según se necesite y los cultivos no se fertilizan, PBBN: Igual que el tratamiento anterior pero los cultivos son fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ en el caso del trigo y 103 kg N ha⁻¹ para el maíz, PBR: El rastrojo de maíz y trigo es fragmentado y dejado sobre la superficie, las camas son reformadas según se necesite y los cultivos no se fertilizan, PBRN: Igual que el tratamiento anterior pero los cultivos son fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ en el caso del trigo y 103 kg N ha⁻¹ para el maíz, ^b CE: Conductividad electrolítica, ^c MSD: Diferencia mínima significativa a un valor de P < 0.05.

Estructura de la comunidad bacteriana en el suelo de los diferentes tratamientos en campo

El número de OTU's obtenidas fue similar en todos los tratamientos, la diversidad (Shannon y Simpson) y la riqueza de especies (Chao1) no mostraron un efecto claro debido a la adición de los residuos de plantas de trigo. El valor del estimador de riqueza Chao1 cambió a través del tiempo, pero no los índices de diversidad. En el suelo control (sin residuos de trigo), el estimador Chao1 se incrementó hasta el día 7 y luego disminuyó, pero en el suelo con residuos de trigo mostró generalmente el valor más alto en el día 1 y después decreció (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de diversidad alfa

Clave ^a	Tratamiento	Día	No. De secuencias	OTUs observadas	ChaoI	índice Shannon	índice Simpson	Diversidad filogenética
CTB	Suelo sin plantas de trigo	0	3463	523	14831.7	3.729	0.988	8.521
		1	3454	567	26282.0	4.037	0.997	8.994
		3	4569	550	16540.7	4.258	0.993	8.780
		7	14720	559	13691.1	3.714	0.997	8.972
		14	9894	538	7834.0	3.356	0.994	8.762
		28	3923	558	7208.3	3.969	0.997	8.996
		56	4986	521	8255.6	3.984	0.991	8.586
	Suelo con plantas de trigo	1	6295	544	14246.6	4.066	0.996	8.846
		3	1215	598	11869.4	3.518	0.998	9.206
		7	8875	558	12685.5	3.885	0.997	8.946
		14	7270	547	9078.4	3.920	0.996	8.868
		28	4073	556	7231.5	3.671	0.996	8.936
		56	3137	555	8402.0	3.722	0.996	8.927
	CTB-N	Suelo sin plantas de trigo	0	5633	521	5729.9	3.153	0.992
1			3150	547	4652.2	3.053	0.998	8.981
3			10442	603	22544.0	4.227	0.998	9.221
7			3104	478	3911.6	2.504	0.989	8.330
14			5346	533	6569.0	3.229	0.995	8.770
28			4309	529	5802.0	3.169	0.996	8.827
56			4635	497	3441.9	2.788	0.994	8.613
Suelo con plantas de trigo		1	3735	532	4215.0	3.319	0.997	8.893
		3	4118	577	10289.7	3.627	0.998	9.080
		7	8440	560	15275.3	3.755	0.996	8.931
		14	7007	502	3607.0	2.733	0.992	8.568
		28	5981	564	7057.0	3.331	0.998	9.037
		56	4883	539	4208.1	3.266	0.997	8.892

Tabla 2. Continuación.

PBB	Suelo sin plantas de trigo	0	3880	541	5068.0	4.173	0.996	8.889
		3	1168	578	10325.6	4.059	0.998	9.083
		7	9523	571	22931.0	3.504	0.997	8.993
		14	11343	534	10596.8	3.271	0.994	8.738
		28	7195	574	12442.5	4.100	0.998	9.060
		56	6776	526	8385.4	4.226	0.993	8.665
	Suelo con plantas de trigo	1	8379	543	17934.0	3.516	0.995	8.792
		3	5233	546	17871.1	3.700	0.996	8.853
		7	6484	548	10448.1	2.977	0.995	8.851
		14	9776	516	10581.5	3.085	0.991	8.587
		28	5565	550	6107.8	3.767	0.997	8.938
		56	4912	573	9583.6	4.036	0.997	9.025
PBB-N	Suelo sin plantas de trigo	0	4421	548	10373.0	3.856	0.997	8.893
		3	616	578	7465.5	3.868	0.998	9.121
		7	8321	547	14512.6	3.395	0.996	8.850
		14	8599	505	10245.5	3.303	0.988	8.441
		28	8089	577	10254.9	4.194	0.998	9.082
		56	3926	529	8451.3	4.225	0.993	8.686
	Suelo con plantas de trigo	1	9682	600	29854.7	4.625	0.998	9.191
		3	6834	535	12520.5	3.934	0.995	8.783
		7	11644	570	13289.0	3.416	0.997	8.999
		14	10803	530	16754.4	2.978	0.992	8.671
		28	3988	546	8013.8	3.915	0.996	8.872
		56	5034	553	16663.1	4.087	0.995	8.847

Tabla 2. Continuación.

PBR	Suelo sin plantas de trigo	0	5993	508	5423.2	3.213	0.993	8.572
		1	3567	531	5604.8	3.183	0.997	8.841
		3	3189	517	3800.2	2.923	0.995	8.733
		7	8682	561	12869.0	3.996	0.997	8.948
		14	11498	523	7141.5	3.049	0.991	8.586
		28	3895	531	6400.3	3.603	0.996	8.830
	56	2975	507	4818.6	3.132	0.993	8.569	
	Suelo con plantas de trigo	1	4138	554	10567.2	3.995	0.997	8.943
		3	5147	538	14032.0	4.148	0.995	8.777
		7	2794	549	8671.1	3.536	0.996	8.876
		14	2971	543	11831.3	3.124	0.995	8.808
		28	3214	541	6394.5	3.532	0.997	8.886
56		4163	568	9833.0	4.639	0.998	9.041	
PBR-N	Suelo sin plantas de trigo	0	4843	537	8232.1	3.995	0.993	8.741
		3	2468	592	13330.5	3.935	0.998	9.175
		7	8824	567	17464.3	3.581	0.997	8.982
		14	7691	532	9876.0	2.839	0.992	8.667
		28	7915	570	13289.0	4.379	0.997	8.994
		56	6468	532	7714.6	4.506	0.992	8.684
	Suelo con plantas de trigo	1	5880	558	7488.1	3.130	0.997	9.002
		3	8836	574	8433.5	3.556	0.998	9.106
		7	7726	453	2691.9	2.242	0.987	8.196
		14	13714	526	4038.8	2.536	0.997	8.830
		28	5836	556	5209.1	2.695	0.998	9.013
		56	5861	501	4394.0	3.057	0.994	8.612

Para determinar el efecto de los diferentes tratamientos en campo sobre la estructura de las comunidades bacterianas del suelo se comparó la estructura de las comunidades bacterianas en el experimento control, es decir, las unidades experimentales sin residuos de trigo.

Diversos grupos bacterianos fueron afectados significativamente debido al manejo de rastrojo en campo, tanto en las parcelas fertilizadas, como en las no fertilizadas, pero hubo más grupos en la primera ($P < 0.01$) (Tabla 3). El análisis de componentes principales (PCA) no mostró separación entre los diferentes tratamientos de campo sin fertilizante (Figura 3) ni con fertilizante (Figura 4).

Tabla 3. Grupos bacterianos afectados significativamente por las prácticas agrícolas en el suelo fertilizado y no fertilizado en la campo experimental Norman E. Borlaug (CENEB) del CIMMYT cerca de Ciudad Obregón, Sonora, México.

Filum	Clase	Orden	Familia	Género
Suelo NO Fertilizado				
I>R=B	Acidobacteria*	Fimbriimonadales**	Fimbriimonadaceae***	<i>Rubrivivax**</i> <i>Fimbriimonas***</i>
I=R>B	Fimbriimonadia**	envOPS12**		
B>R=I	Thermoleophilia***, TK10*	B07_WMSP1**	FFCH4570**	otro FFCH4570**
B>I>R			[Chromatiaceae]**	otro [Chromatiaceae]**
B=R>I	S035*			
B=I>R	Gammaproteobacteria**			otro Bacillaceae***
R>I=B	Acidobacteria* Acidobacteria-5* Acidobacteria-6*, SJA-28*	iii1-15**, Rhizobiales***, Burkholderiales***	mb2424**, OPB35***	<i>Ochrobactrum***</i> , otro Alcaligenaceae** <i>Variovorax***</i> <i>Curvibacter***</i>
R>I>B	Betaproteobacteria***			

B: Rastrojo quemado, R: Rastrojo retenido, I: Rastrojo incorporado.

Tabla 3. Continuación.

Suelo Fertilizado				
I>R>B	Acidobacteria***			
I>R=B		Acidobacteria-6** Chloracidobacteria **	iii1-15***, RB41***, Rhizobiales***	Brucellaceae*** <i>Flavisolibacter**</i> , <i>Ochrobactrum***</i> <i>Variovorax***</i>
I=R>B		Alphaproteobacteria** Cytophagia*, Clostridia*	SBR1031**	Ellin6075**, otro Ellin6075**
B>R=I	Firmicutes† OP11†, TM6*	Bacilli*, OP11-4*, SBRH58** Atl2OctB3*		Promicromonosporaceae** <i>Xylanimicrobium***</i> , otro Bacillaceae**
B=R>I	Actinobacteria*	Thermoleophilia***, S085*		Xanthomonadaceae*
B=I>R	Armatimonadetes†			
R>I=B	WS6*	Armatimonadia**, Gemm-1* Planctomycetia*	Armatimonadales**Pi rellulales**, Rhodospirillales**	Armatimonadaceae**, Pirellulaceae** Rhodospirillaceae** Erythrobacteraceae***, OPB35** <i>Candidatus Solibacter**</i> otro Cythphagaceae**, <i>Clostridium**</i> otro Gemataceae** otro Pirellulaceae** <i>Hyphomicrobium***</i> otro Rhizobiaceae** otro Opiritaceae**

† Significativo a $P \leq 0.05$, * Significativo a $P < 0.01$, ** Significativo a $P < 0.001$, *** Significativo a $P < 0.0001$.

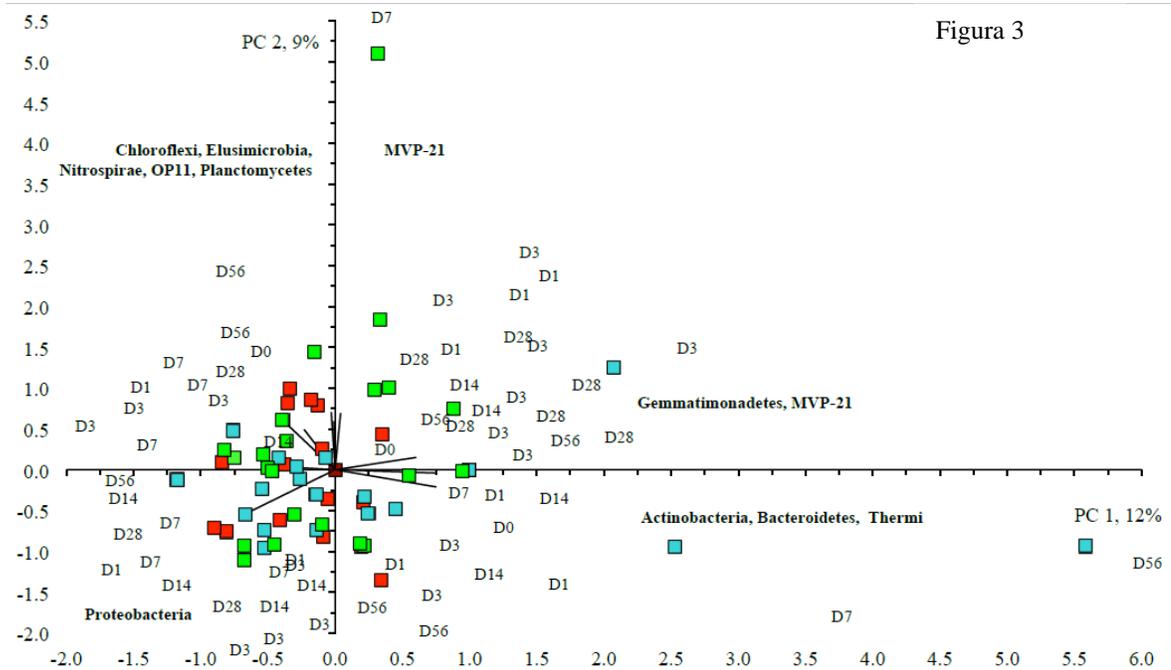


Figura 3

Figura 3. Análisis de componentes principales considerando la abundancia relativa de los fila encontrados en los tratamientos agrícolas sin fertilizar en el Campo Experimental Norman E. Borlaug' (CENEB). Con el rastreo incorporado mediante la labranza convencional (CTB, ■), con el rastreo quemado post-cosecha y camas reformadas (PBB, ■) y con el rastreo de maíz y trigo fragmentado y retenido sobre la superficie y camas reformadas (PBR, ■). Muestras de suelo tomadas al día 0 (D0), día 1 (D1), día 3 (D3), día 7 (D7), día 14 (D14), día 28 (D28) y día 56 (D56).

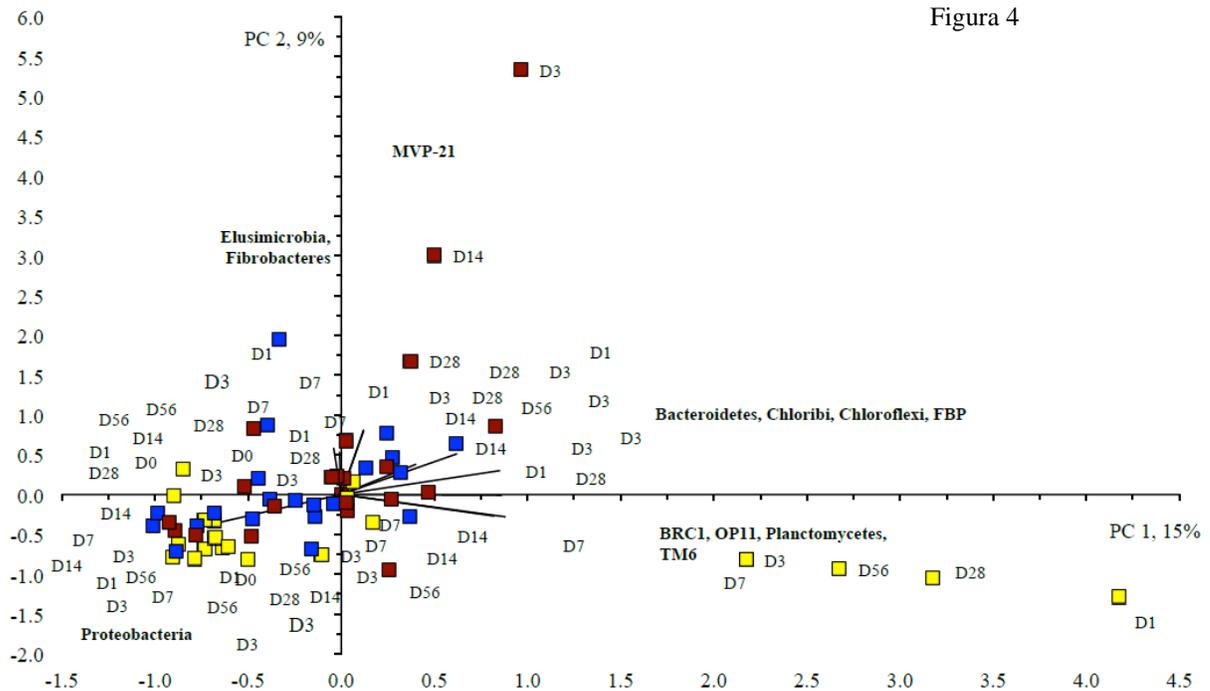


Figura 4

Figura 4. Análisis de componentes principales considerando la abundancia relativa de los fila encontrados en los tratamientos agrícolas fertilizados del Campo Experimental Norman E. Borlaug' (CENEB). Con el rastreo incorporado mediante la labranza convencional (CTBN, ■), con el rastreo quemado post-cosecha y camas reformadas (PBBN, ■) y con el rastreo de maíz y trigo fragmentado y retenido sobre la superficie y camas reformadas (PBRN, ■). Muestras de suelo tomadas al día 0 (D0), día 1 (D1), día 3 (D3), día 7 (D7), día 14 (D14), día 28 (D28) y día 56 (D56).

La aplicación de urea en campo mostró un efecto significativo en el incremento de la abundancia relativa del género *Nitrosovibrio* (filo, Proteobacteria; clase, Betaproteobacteria; orden, Nitrosomonadaceae; familia, Nitrosomonadales) en los tres casos (CTBN, PBBN y PBRN) (Tabla 4). Aunque la abundancia relativa de otros grupos bacterianos fue afectada por la aplicación de fertilizante de manera altamente significativa ($P < 0.0001$), el efecto fue más marcado en el tratamiento PBRN. El análisis perMANOVA mostró que la aplicación de fertilizante tiene un efecto significativo en la estructura de comunidad bacteriana comparado con el suelo sin fertilizar con excepción del tratamiento con rastrojo quemado (Tabla 5). El carbono orgánico fue la característica que afectó de manera significativa al mayor número de grupos bacterianos, i.e. Armatimonadetes, BRC1, Chloroflexi, FBP y WS2 ($P < 0.05$) (Tabla 6). El pH, nitrógeno total, relación C/N y contenido de arcilla también afectaron significativamente diversos grupos bacterianos pero no el contenido de arena, limo o la conductividad electrolítica. El análisis de correlación canónica CCA, no separó a los tratamientos agrícolas y la variación entre las réplicas de un mismo tratamiento fue amplia (Figura 5).

Tabla 4. Grupos bacterianos afectados significativamente por la aplicación de fertilizante en el campo experimental Norman E. Borlaug (CENEB) del CIMMYT cerca de Ciudad Obregón, Sonora, México.

La abundancia relativa de los siguientes grupos fue mayor en los tratamientos fertilizados que en los NO fertilizados			
	Rastrojo quemado	Rastrojo incorporado	Rastrojo retenido
Filum	BRC1 †, OP11 †, TM6 †	Acidobacteria*, Chloroflexi †	Chloroflexi*, Nitrospirae †, Planctomycetes †, WPS-2 †
Clase	Planctomycetia*	Acidobacteria-6*, S035*, Anaerolineae*, Alphaproteobacteria***	Thermomicrobia**
Orden	Nitrosomonadales***	Rhizobiales***, Nitrosomonadales**	AKYG1722***, Rhodospirillales***
Familia	Nitrosomonadaceae***	Thiobacteraceae *** Nitrosomonadaceae**	Nitrosomonadales*** Rhodospirillaceae *** Nitrosomonadaceae*** Xanthomonadaceae***
Género	<i>Nitrosovibrio</i> ***	<i>Ochrobactrum</i> ***, <i>Variovorax</i> *** <i>Nitrosovibrio</i> **	<i>Devosia</i> ***, <i>Nitrosovibrio</i> ***
La abundancia relativa de los siguientes grupos fue mayor en los tratamientos NO fertilizados que en los fertilizados			
Filum		Fibrobacteres †, TM6 †, WS3 †	Acidobacteria †, Cyanobacteria †
Clase	Chloroflexi*, P2-11E*	Gammaproteobacteria*, SJA-4*	Acidobacteria-6*
Orden			Rhizobiales***, Burkholderiales***
Familia			Brucellaceae***
Género		<i>Fimbrimonas</i> ** , <i>Curvibacter</i> **	<i>Ochrobactrum</i> ***, <i>Variovorax</i> ***
† Significativo a $P \leq 0.05$, * Significativo a $P < 0.01$, ** Significativo a $P < 0.001$, *** Significativo a $P < 0.0001$			

Tabla 5. Análisis perMANOVA basado en la matriz de distancias pareadas UniFrac para comparar las diferencias en las poblaciones bacterianas entre las muestras de suelo, los tratamientos y el tiempo de incubación

Comparación	F	P
Prácticas agrícolas	3.7877	< 0.001
Suelo con residuos de trigo versus suelo sin trigo	8.8675	< 0.001
CB (labranza) versus PB (sin labranza)	8.9018	< 0.001
Sin fertilizar versus fertilizado	2.1929	0.008
<i>Rastrojo Retenido</i>		
Suelo con residuos de trigo versus suelo sin trigo	4.1339	< 0.001
Aplicación de nitrógeno	4.7154	< 0.001
Tiempo de incubación	1.5545	< 0.001
<i>Rastrojo incorporado</i>		
Suelo con residuos de trigo versus suelo sin trigo	2.5357	< 0.001
Aplicación de nitrógeno	4.3883	< 0.001
Tiempo de incubación	1.5896	< 0.001
<i>Rastrojo quemado</i>		
Suelo con residuos de trigo versus suelo sin trigo	5.4350	< 0.001
Aplicación de nitrógeno	1.2937	0.147
Tiempo de incubación	4.4989	< 0.001

Tabla 6. Correlación entre las características del suelo y la abundancia relativa de los filamentos bacterianos encontrados en el suelo sin residuos de trigo en el campo experimental Norman E. Borlaug (CENEB) del CIMMYT cerca de Ciudad Obregón, Sonora, México.

Característica del suelo	Filum
pH	(-) FBP †, (-) Nitrospirae *
Total C	(-) Armatimonadetes*, (+) BRC1†, (+) Chloroflexi*, (+) FBP*, (+) WS2**
Total N	(-) Armatimonadetes*, (-) Cyanobacteria†, (+) Elusimicrobia†, (+) FBP*
Relación C/N	(-) Acidobacteria*, (-) Bacteroidetes†, (+) OP11
Contenido de arcilla	(-) Cyanobacteria*

(-) Correlación negativa, (+) Correlación positiva, † Significativo a P < 0.05, * Significativo a P < 0.01, ** Significativo a P < 0.001.

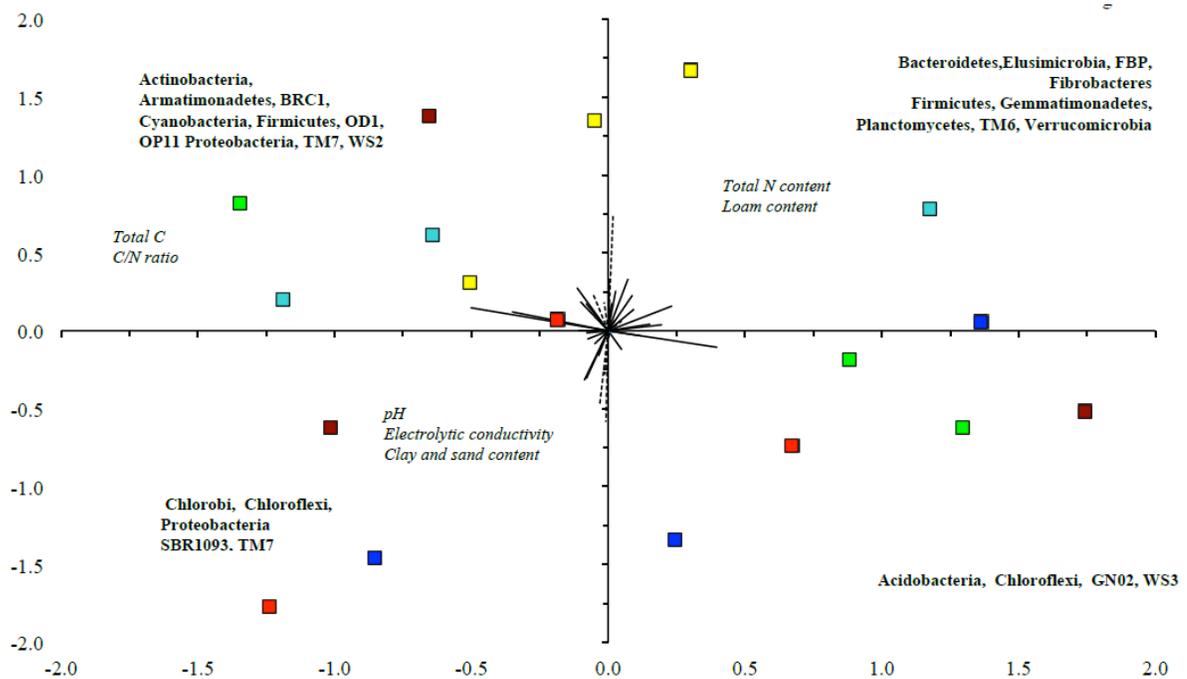


Figura 5. Análisis de correlación canónica considerando la abundancia relativa de los diferentes fila bacterianos y las características fisicoquímicas de los seis distintos tratamientos agrícolas en el Campo Experimental Norman E. Borlaug⁷ (CENEB). Con rastreo incorporado mediante labranza convencional, camas reformadas y cultivos no fertilizados (CTB, ■) o fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ para trigo y 103 kg N ha⁻¹ para maíz (CTBN, ■), rastreo quemado, camas permanentes reformadas según sea necesario y cultivos sin fertilizar (PBB, ■) o fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ para trigo y 103 kg N ha⁻¹ para maíz (PBBN, ■) y rastreo fraccionado y retenido en la superficie, camas permanentes reformadas según sea necesario y cultivos sin fertilizar (PBR, ■) o fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ para trigo y 103 kg N ha⁻¹ para maíz (PBRN, ■).

Emisiones de CO₂ y evolución del nitrógeno mineral

La emisión de CO₂ no fue afectada significativamente por las diferentes prácticas agrícolas (Figura 6). Por otra parte, la adición de residuos de trigo incrementó significativamente ($P < 0.0001$) la emisión de CO₂ producto de la mineralización, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. En promedio, el 48% del carbono orgánico aplicado se mineralizó al cabo de los 56 días de la dinámica, considerando que no hubo efecto "priming" (una descomposición adicional del carbono orgánico del suelo después de la adición de sustancias orgánicas fácilmente descomponibles). El nitrógeno mineral no se incrementó con el tiempo en el caso del suelo control sin residuos de trigo y tampoco fue significativamente diferente entre los diferentes tratamientos agrícolas (Figura 6). La adición de residuos de trigo al suelo incrementó significativamente ($P < 0.001$) la cantidad de nitrógeno mineral en promedio unos 24 mg N kg⁻¹ suelo. Así que la mineralización del nitrógeno proveniente del material vegetal adicionado fue de 94 g kg⁻¹ al final del periodo de incubación, considerando que no hubo efecto "priming".

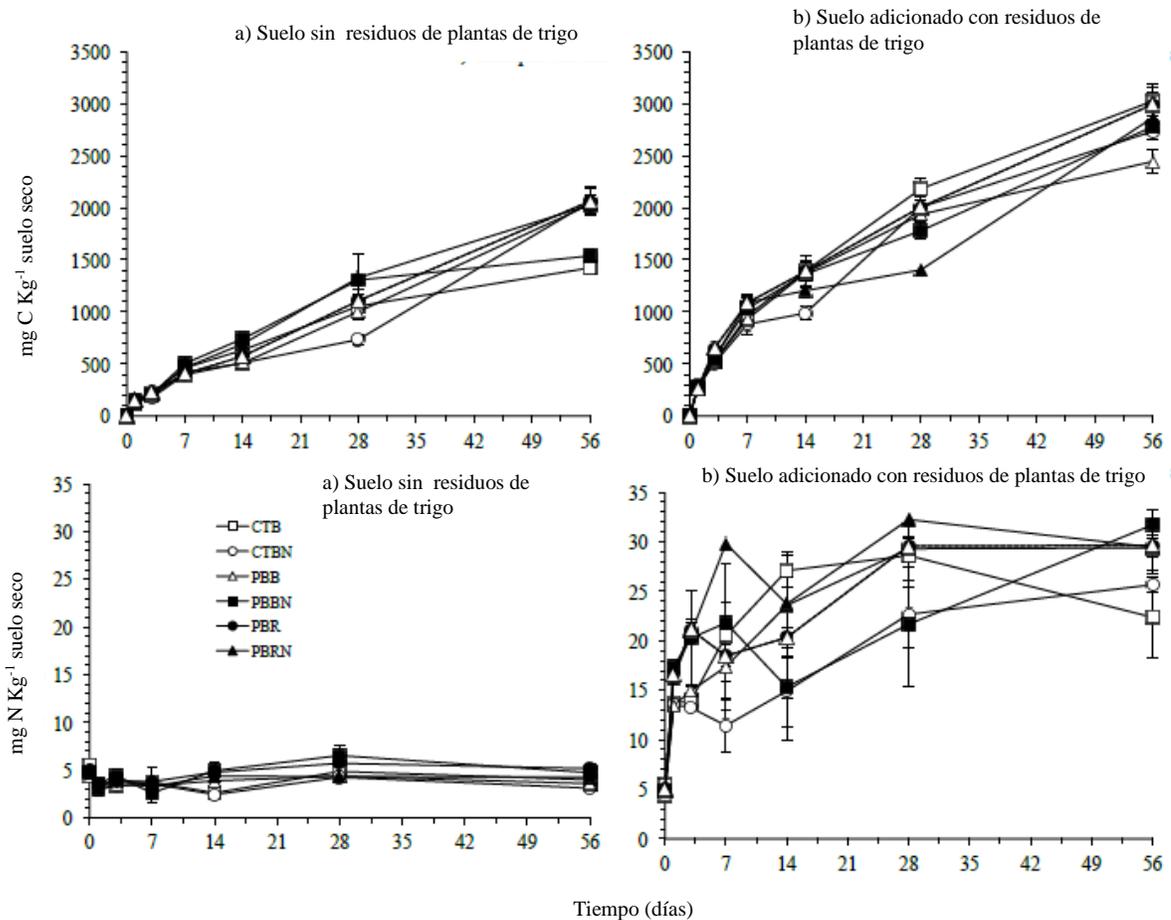


Figura 6. Emisión de CO₂ (mg C kg⁻¹ suelo) y nitrógeno mineral N (mg N kg⁻¹ suelo) en el Campo Experimental Norman E. Borlaug' (CENEB). Con rastrojo incorporado mediante labranza convencional, camas reformadas y cultivos no fertilizados (CTB, □) o fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ para trigo y 103 kg N ha⁻¹ para maíz (CTBN, ○), rastrojo quemado, camas permanentes reformadas según sea necesario y cultivos sin fertilizar (PBB, △) o fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ para trigo y 103 kg N ha⁻¹ para maíz (PBBN, ■), y rastrojo fraccionado y retenido en la superficie, camas permanentes reformadas según sea necesario y cultivos sin fertilizar (PBR, ●) o fertilizados con 300 kg N ha⁻¹ para trigo y 103 kg N ha⁻¹ para maíz (PBRN, ▲).

Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en el suelo adicionado con residuos de plantas de trigo

Para determinar el efecto de la adición de residuos de trigo sobre las poblaciones bacterianas, se comparó la abundancia relativa de los diferentes grupos bacterianos con respecto al control. Se describen a continuación todos los grupos que incrementan en su abundancia relativa por la adición de residuos de trigo con respecto al control (Tabla 8), y posteriormente, todos los grupos que disminuyen en su abundancia (Tabla 7).

La adición de residuos de trigo incrementó la abundancia relativa de los filo Actinobacteria y Firmicutes en todos los tratamientos (Tabla 8). El efecto sobre los niveles taxonómicos más bajos no fue uniforme, pero la abundancia relativa de los órdenes Actinomycetales, Bacillales y Xanthomonadales, y de los géneros *Promicromonospora* y *Bacillus* se incrementaron en los diferentes tratamientos agrícolas. Por el contrario, un amplio número de grupos disminuyeron sus abundancias relativas en algunos de los tratamientos agrícolas, por ejemplo, en PBB sin fertilizante y PBR con fertilizante, aunque en otros tratamientos el efecto fue limitado como en el caso de CTB tanto fertilizado como no fertilizado y PBR no fertilizado. En todos los tratamientos la adición de residuos de trigo provocó la disminución de la abundancia relativa del filo Acidobacteria.

El análisis perMANOVA mostró en todos los tratamientos agrícolas que, independientemente del fertilizante, la estructura de la comunidad bacteriana fue definida por la adición de residuos de trigo de manera altamente significativa ($P < 0.001$) (Tabla 5). Por consiguiente, el análisis de PCA generado con la información taxonómica, separó al suelo con trigo del control sin trigo

(Figura 7). Algunas de las muestras del tratamiento PBBN sin trigo se separaron de sus réplicas debido a que la abundancia relativa del filo Chloroflexi fue mayor en estos casos.

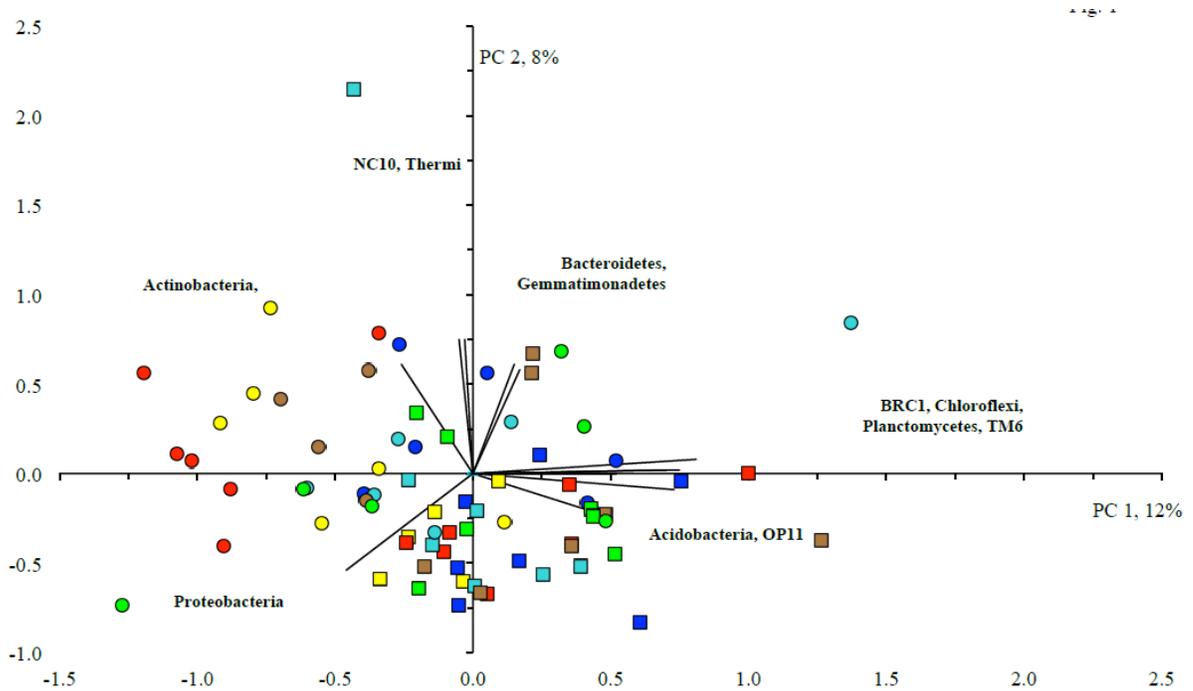


Figura 7. Análisis de componentes principales considerando la abundancia relativa de los diferentes filo en: el suelo fertilizado, con el rastrojo quemado y sin residuos de trigo PBBN, (■) o con residuos de trigo PBBN+W (●), suelo sin fertilizar, con el rastrojo quemado y sin residuos de trigo PBB (■) o con residuos de trigo PBB+W (●), suelo fertilizado, con el rastrojo incorporado y sin residuos de trigo CTBN, (■) o con residuos de trigo CTBN+W (●), suelo sin fertilizar, con el rastrojo incorporado y sin residuos de trigo CTB (■) o con residuos de trigo CTB+W (●), suelo fertilizado, con el rastrojo retenido y sin residuos de trigo PBRN, (■) o con residuos de trigo PBRN+W (●), suelo sin fertilizar, con el rastrojo retenido y sin residuos de trigo PBR (■) o con residuos de trigo PBR+W (●). Suelo en incubación aeróbica a 22 ± 2 °C por 56 días.

Tabla 7. Grupos bacterianos cuya abundancia relativa disminuye significativamente por la adición de residuos de plantas de trigo con respecto al control del suelo en la campo experimental Norman E. Borlaug (CENEB) del CIMMYT cerca de Ciudad Obregón, Sonora, México.

Suelo NO Fertilizado			
	Rastrojo quemado	Rastrojo incorporado	Rastrojo retenido
Filum	Acidobacteria***, Armatimonadetes †, Chlorobi †, Chloroflexi***, Gemmatimonadetes*, Nitrospirae †, Planctomycetes***, Verrucomicrobia †	Acidobacteria*	Acidobacteria*, Gemmatimonadetes*
Clase	Acidobacteria-6***, Solibacteres**, Sva0725*, Chloracidobacteria*, MB-A2-108*, Rubrobacteria***, Thermoleophilia**, 0319-6E2*, Anaerolineae***, Chloroflexi*, Clostridia*, Gemm-3*, Phycisphaerae**, Planctomycetia*, Deltaproteobacteria***	Fimbriimonadia** Planctomycetia*	
Orden	iii1-15***, Rubrobacterales***, Syntrophobacterales***, Enterobacterales***		
Familia	RB40***, Rubrobacteraceae***		
Suelo Fertilizado			
Filum	Acidobacteria ***, BRC1 †, Chloroflexi †, Gemmatimonadetes *, Planctomycetes †, TM6 *	Acidobacteria***	Acidobacteria***, Chloroflexi***, Elusimicrobia*, Nitrospirae*, OD01 †, Planctomycetes***, Verrucomicrobia †, WS2 †
Clase	Acidobacteria-6***, C0119*, Deltaproteobacteria*	Acidobacteria-6* Chloracidobacteria*	otro*, Acidobacteria-6*, S035*, Solibacteres*, Sva0725**, Chloracidobacteria***, Armatimonadia*, Anaerolineae***, C0119*, Elusimicrobia*, Gemmatimonadetes*, Nitrospira*, Phycisphaerae***, Deltaproteobacteria***
Orden	iii1-15***		iii1-15***, RB41***, S0208***, SBR1031***, WD2101***, MND1***, Syntrophobacterales***
Familia			mb2424***, Ellin6075***, A4b***, Syntrophobacteraceae***,
† Significativo a P < 0.05, * Significativo a P < 0.01, ** Significativo a P < 0.001, *** Significativo a P < 0.0001.			

Tabla 8. Grupos bacterianos cuya abundancia relativa aumenta significativamente por la adición de residuos de plantas de trigo con respecto al control del suelo en la campo experimental Norman E. Borlaug (CENEB) del CIMMYT cerca de Ciudad Obregón, Sonora, México

Suelo NO fertilizado			
	Rastrojo quemado	Rastrojo incorporado	Rastrojo retenido
Filum	Actinobacteria*, Firmicutes**	Actinobacteria †, Bacteroidetes †, Firmicutes †	Bacteroidetes †, Firmicutes †
Clase	Actinobacteria***, Bacilli**	Saprospirae***	Actinobacteria*, Bacilli***
Orden	Actinomycetales***	Saprospirales***, Xanthomonadales***	Bacillales***
Familia	Promicromonosporaceae***, Streptomyetaceae***, Enterobacteriaceae***	Chitinophagaceae***	Bacillaceae***
Género	<i>Promicromonospora</i> ***		<i>Bacillus</i> ***
Suelo Fertilizado			
Filum	Actinobacteria***, Firmicutes †	Actinobacteria ***, Bacteroidetes *, Firmicutes †	Actinobacteria*, Firmicutes***
Clase	Actinobacteria***	Actinobacteria*, Cytophagia*	Actinobacteria***, Saprospirae*, Bacilli***
Orden	Actinomycetales***	Xanthomonadales***	Actinomycetales***, Bacillales***
Familia	Microbacteriaceae***, Promicromonosporaceae***, Streptomyetaceae***	Xanthomonadaceae***	Promicromonosporaceae***, Chitinophagaceae***, Bacillaceae***, Rhizobiaceae***, Xanthomonadaceae***
Género	<i>Agromyces</i> ***, <i>Promicromonospora</i> ***, <i>Streptomyces</i> ***		<i>Promicromonospora</i> ***, <i>Bacillus</i> ***, <i>Sinorhizobium</i> ***, <i>Lysobacter</i> ***
† Significativo a P < 0.05, * Significativo a P < 0.01, ** Significativo a P < 0.001, *** Significativo a P < 0.0001.			

Discusión de los resultados

Características fisicoquímicas del suelo

La retención del rastrojo sobre la superficie del suelo incrementa significativamente el contenido de carbono orgánico, comparado con el suelo donde el rastrojo se incorpora a unos 20 cm de profundidad mediante la tarea de labranza o aquel suelo donde el rastrojo es quemado. Esta observación confirma lo observado por Verhulst et al. en el año 2011 en este mismo sitio experimental. Al respecto, Resck et al. (1999) sugirieron que en suelos donde se aplica la labranza la materia orgánica se mineraliza más rápido que en suelos donde no se labra, debido a que los microorganismos entran en contacto directo con el sustrato. Esto es algo parecido a lo que sucede en una composta donde, entre más pequeños sean los fragmentos de materia orgánica y mejor mezclados estén, más rápidamente se mineralizarán. Además de incrementar la aireación, la labranza rompe los agregados, liberando material orgánico que se encuentra físicamente protegido, de este modo queda expuesto al ataque microbiano y así el carbono orgánico se consume más rápido (Carvalho et al., 2009). Los residuos dejados en la superficie son incorporados al suelo lentamente, por lixiviación y a través de la actividad de organismos más grandes como las lombrices (Kladivko et al., 2001), así, es más probable que la mineralización lleve más tiempo. La humedad juega un papel importante en la descomposición de la materia orgánica, por ejemplo, en climas semiáridos como el de Ciudad Obregón, Sonora, la descomposición en la superficie es más difícil, entonces la materia orgánica se acumula. Por otra parte, los valores de pH y conductividad electrolítica fueron más altos en los tratamientos agrícolas PBB, PBBN (rastrojo quemado) que en CTB, CTBN y PBR, PBRN, (rastrojo

incorporado y retenido). Xue et al. (2014) observaron un incremento importante en el pH del suelo después de un incendio forestal y explican que la alcalinización ocurre porque la combustión de la materia orgánica libera metales alcalinos y alcalinoterreos (Na, K, Ca y Mg), son desnaturalizados los ácidos orgánicos y consumidos los iones hidrógeno para la formación de agua durante el incendio. Además, al quemar los residuos se reduce la infiltración y se incrementa la evaporación, lo que provoca una mayor acumulación de sales en la superficie. El incremento en la concentración de sales se puede reflejar en un aumento en la conductividad electrolítica (Verhulst et al., 2011b), como en el caso del suelo del exlago de Texcoco.

Efecto de las prácticas agrícolas sobre la estructura de la comunidad bacteriana

La quema de materia orgánica provoca cambios profundos en las características del suelo y en las poblaciones bacterianas (Virto et al., 2007; Paredes Junior et al., 2015). Por ejemplo, Sul et al. (2013), encontraron que en un suelo agrícola con bajo contenido de carbono orgánico (0.8 %) y no sometido a quema de rastrojo el principal filo presente es Actinobacteria, mientras que los Bacillales (Firmicutes) son más abundantes en un suelo con alto contenido de carbono orgánico (1.29 %) y sometido a quema de rastrojo postcosecha. Esto lo atribuyen a que el orden Bacillales incluye a muchas especies con un amplio intervalo de características, por ejemplo, la capacidad para formar esporas y resistir el calor, lo cual les permiten sobrevivir después de un incendio o en un ambiente seco y caluroso sin una capa protectora de residuos vegetales que impida que los rayos del sol incidan directamente sobre el suelo (Marles-Wright y Lewis, 2007).

Ferrenberg et al. (2013) estudiaron un suelo forestal y encontraron que la abundancia de Firmicutes es baja en el suelo no perturbado, pero que después de un incendio forestal se vuelve

dominante, por lo tanto, infieren que Firmicutes juega un papel importante en la sucesión temprana del paisaje. Quemar rastrojo en campo es menos severo que un incendio en un bosque o en un pastizal porque hay menos material vegetal y las temperaturas que alcanza el fuego son menores. Por consiguiente, en este estudio la quema tiene un efecto menor sobre la estructura de la comunidad bacteriana comparando con otros trabajos. Contrariamente a lo que reportaron en los trabajos antes mencionados, el género *Bacillus* fue favorecido por la adición de residuos de trigo, pero no en los tratamientos con rastrojo quemado sino en los tratamientos con rastrojo retenido (PBR y PBRN), es decir que se incrementó su abundancia relativa de manera altamente significativa ($P < 0.0001$) con respecto al suelo sin la adición de residuos de trigo.

Con respecto al manejo de rastrojo retenido, Navarro-Noya et al. (2013) encontraron que la retención de rastrojo en un suelo agrícola incrementaba la abundancia de Bacteroidetes, pero disminuía la de Cyanobacteria y Gemmatimonadetes en comparación con parcelas donde el residuo fue removido. Queda claro que no sólo la materia orgánica provoca cambios en la abundancia relativa de los diferentes grupos bacterianos, sino también las características fisicoquímicas como resultado de las prácticas agrícolas y las interacciones entre esas características (Xiong et al., 2012). Los cambios observados en las características fisicoquímicas del suelo en este estudio son menores que las encontradas en el estudio de Navarro-Noya et al. (2013), así que es de esperarse que el efecto sea menor o incluso distinto, como puede observarse en la Tabla 7, por ejemplo, que el filo Acidobacteria se encuentra presente indistintamente, tanto en el tratamiento quemado (sin rastrojo dado que se está eliminando) como en los tratamientos retenido e incorporado.

La abundancia relativa del género *Nitrosovibrio* incrementó por efecto de la fertilización en comparación con el suelo no fertilizado. Existe evidencia que sugiere que las cepas de *Nitrosovibrio* son adaptables a diferentes ambientes, tanto terrestres como acuáticos (Hall et al., 1986) y que tienen una función ecológica importante en el proceso de nitrificación (Head et al., 1993). *Nitrosovibrio* spp. son capaces de fijar CO₂ por la vía del ciclo de Calvin y oxida el amonio a nitrito para producir energía (Bock et al., 1986). Shah et al. (2011), encontraron una abundancia inusualmente alta de *Nitrosovibrio* (41%) en un suelo forestal con textura arenosa, baja fertilidad y pH de 4-4.5, donde se encuentra usualmente en una abundancia no mayor a 1%. Dichos autores postulan que el papel de *Nitrosovibrio* en un ecosistema de bosque se centra en la oxidación de amoníaco. Análogamente, se podría especular que en el CENEB la fertilización con urea puede favorecer a dicho grupo, debido a que en suelos con pH básico se hidroliza formando amonio y bicarbonato.

Efecto de la adición de materia orgánica sobre la comunidad bacteriana

La abundancia relativa del filo Acidobacteria disminuyó en todos los tratamientos agrícolas cuando se adicionaron los residuos de trigo. Resultados similares se obtuvieron por Thomson et al. (2013), en un suelo de pradera en Escocia. Ellos encontraron que el filo dominante en una zona sin cubierta vegetal era Acidobacteria, pero que su abundancia disminuía en el suelo con vegetación, rico en carbono y nitrógeno, lo cual indica que Acidobacteria prefieren ambientes pobres en nutrientes. Li et al. (2011) marcaron callos de arroz con ¹³C y los sometieron a descomposición en suelo de un arrozal para estudiar a los microorganismos involucrados en la degradación del material marcado y encontraron que Acidobacteria estaba relacionada a la fracción ligera (¹²C) o no marcada, por lo que concluyeron que Acidobacteria no usa de manera

directa la fuente de carbono adicionada. Esto podría deberse a que probablemente los integrantes de este filo usan fuentes secundarias de carbono producidas por otros microorganismos que aprovechan los compuestos fácilmente asimilables. De modo que este filo muestra un comportamiento de tipo oligotrófico, es decir, que prefiere ambientes pobres en nutrientes. A los organismos que presentan este tipo de comportamiento también se les conoce como estrategias *K*, mientras que a aquellos que prefieren ambientes ricos en nutrientes se les conoce como estrategias *r*.

Por efecto de la adición de los residuos de trigo, un buen número de fila fueron afectados en su abundancia relativa, por ejemplo, Armatimonadetes y Chlorobi en PBB; BRC1 y TM6 en PBBN; y Elusimicrobia, OD01 y WS2 en PBRN. Se sabe poco de estos fila pero su abundancia relativa raramente excede el 1 %. Entonces, podemos especular que estos fila de baja abundancia presentan una estrategia de vida de tipo *K*, es decir, usan compuestos orgánicos de difícil descomposición como fuente de carbono. Todos estos grupos son desplazados por aquellas bacterias degradadoras de materia orgánica fresca o estrategias *r* cuando se agregan las plantas molidas de trigo. La adición de residuos de trigo incrementó la abundancia relativa de Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, dichos grupos están pues, involucrados en la degradación inicial de los residuos de trigo y en la formación de los primeros productos metabólicos (estrategas *r*). Pascault et al. (2013), también encontraron Firmicutes en un suelo calcáreo, limoso-arcilloso en Francia después de la adición de residuos de trigo. Y algunos años atrás en este mismo sitio realizando un experimento muy parecido, Bernard et al. (2007) encontraron seis fila involucrados en la degradación de las plantas de trigo, entre los que se encuentra Actinobacteria, lo cual es consistente con nuestros resultados. El Zahar Haichar et al. (2007) mencionan que los Bacteroidetes son considerados consumidores primarios debido a su

habilidad para degradar celulosa. Semenov et al. (2012) encontraron *Arthrobacter humícola*, una Actinobacteria, después de la incorporación de residuos de plantas de papa frescos en un suelo donde se cultiva papa. En los Países Bajos Lee et al. (2011) reportaron que Actinobacteria es favorecido al agregar callos de arroz secos a un suelo de arrozal en Japón.

Todos los datos relacionados a la estructura de la comunidad bacteriana son relativos, no absolutos. Sin embargo, varios estudios demuestran que la biomasa microbiana se incrementa tras la adición de materia orgánica y eventualmente regresa a su cantidad inicial tras haber agotado los recursos (Diacono and Montemurro, 2010; Ghosh et al., 2011). Además, en este trabajo se encontró que la riqueza de especies, aunque aumenta tras los primeros días después de la adición de materia orgánica, disminuye al valor inicial en los últimos días de la incubación.

Conclusión

Los cambios en la abundancia relativa de los fila bacterianos observados en este estudio son congruentes con ciertos hallazgos reportados por otros autores, con similares (plantas de trigo)

y distintos sustratos (plantas de papa, callos de arroz), diferentes tipos de suelo, características fisicoquímicas, sitios geográficos y condiciones climáticas. Adicionalmente y debido a la técnica de secuenciación masiva empleada en el presente estudio, fue posible detectar otros filas con abundancias relativas por debajo de 0.1 % considerados como raros (además de un gran número de géneros), que no es posible observar en trabajos como los antes mencionados y de los cuales hay muy poca información. Las prácticas agrícolas influyen en y diferencian la estructura de la comunidad, mayormente a nivel de género, lo cual confirma la hipótesis planteada. Las diferencias entre las prácticas agrícolas no afectaron el potencial de mineralización del suelo, como lo muestra la producción de CO₂, y la diversidad total de grupos bacterianos no cambia entre los tratamientos como se aprecia en las tablas de índices de diversidad. Aparentemente, a pesar de que los grupos bacterianos se expresan diferencialmente en función de las prácticas agrícolas y sus respectivas condiciones fisicoquímicas, el incremento en la biomasa es proporcional. Aún quedan cuestiones por resolver sobre la manera en que la agricultura y sus diversos aspectos influyen sobre los microorganismos del suelo y potencialmente sobre la salud, calidad y productividad del suelo.

Recomendaciones

Tal vez uno de los problemas más importantes al momento de estudiar las bacterias del suelo es la dificultad para hacerlas crecer en un medio de cultivo, lo cual limita el estudio de las mismas.

Este hecho cobra relevancia al momento de buscar información para averiguar la función de los grupos bacterianos a los más bajos niveles taxonómicos, por ejemplo género. El análisis de una estructura poblacional bacteriana a nivel de filo deja muchas dudas y no permite generalizar las observaciones por el hecho de tratarse de un nivel muy alto, es decir, un Filo es el conjunto de un gran número de Géneros pero no todos los géneros de ese Filo presentan las mismas capacidades metabólicas, incluso, podrían tener características biológicas muy diferentes. Lo ideal es analizar el nivel taxonómico más bajo posible y con el mayor poder de resolución con el objetivo de obtener información lo más específica posible sobre los grupos presentes.

Las recientes plataformas de secuenciación masiva representan una poderosa herramienta para explorar con gran detalle la inmensa diversidad y abundancia microbiana en un ambiente natural, incluso ha permitido el descubrimiento de nuevas bacterias y nos ha mostrado la gran diversidad bacteriana que todavía desconocemos. Pero mientras no se incrementa de manera sustancial el conocimiento y la descripción de los grupos edáficos ya descubiertos, se corre el riesgo de generar únicamente enormes listados de nombres de difícil pronunciación, asociados a un valor numérico de abundancia, difíciles de interpretar y con poco sentido funcional y ecológico.

Aunado a este gran desconocimiento de la función ecológica y características biológicas de los pocos (comparados con lo que se sabe que falta por conocer) grupos bacterianos del suelo que se han podido cultivar y aislar, se suma la falta de información en las bases de datos relacionadas a secuencias de rDNA 16S. Lo anterior demuestra que a pesar del gran aporte tecnológico que representan las plataformas de secuenciación masiva, no siempre es posible saber la identidad de una importante fracción de todas las secuencias encontradas, que alinean con alguna

secuencia previamente reportada y que putativamente representa a una entidad biológica real, pero de la cual sólo se conoce un pequeño fragmento de su genoma y que queda englobada en un nivel taxonómico superior.

En este sentido, resulta evidente la necesidad de aumentar el interés en el estudio de los grupos bacterianos (sobre todo edáficos) que se han logrado aislar y cultivar en laboratorio, para que de este modo sea posible enriquecer la literatura y las bases de datos genómicos que permitan plantear hipótesis y teorías lo más cercanas a la realidad, al momento de hacer inferencias sobre la presencia de un número de grupos bacterianos en un ambiente con características fisicoquímicas específicas.

Perspectivas

En este trabajo las características fisicoquímicas del suelo entre los distintos tratamientos fueron muy parecidas a pesar de la diferencia en las prácticas agrícolas, entonces, ¿qué tan intensas o destructivas y duraderas deben ser la labranza o la quema de rastrojo para notar un cambio importante en las características fisicoquímicas de un suelo como el del presente caso de

estudio?, ¿hasta qué punto es posible hacer una predicción sobre el efecto de los cambios en las características fisicoquímicas sobre al menos un grupo bacteriano en un suelo con fluctuaciones medioambientales? ¿qué tan drásticos y duraderos deben ser los cambios en las características fisicoquímicas del suelo como para notar una disminución irreversible en la diversidad microbiana?, ¿se perdería el potencial de descomposición de la materia orgánica bajo tales condiciones?, ¿qué tan resistente sería la microbiota del suelo ante prácticas agrícolas drásticas y desfavorables, y en qué punto se comenzarían a notar cambios genéticos (en las bacterias) en respuesta a la adaptación?, ¿qué grupos (hongos, bacterias, arqueas, protozoos...) se perderían primero y cuáles serían los últimos en desaparecer?. En México, la agricultura se practica principalmente de forma tradicional (labrando el suelo, eliminando el rastrojo y dando poca o nula rotación a los cultivos), la irrigación depende de las lluvias, la producción; de los agroquímicos, se usa cualquier tipo de suelo sin importar el clima, la fertilidad o la topografía, resultando muchas veces en bajos rendimientos, así como grandes extensiones de terrenos erosionados y abandonados. Éste es el escenario real de un mal manejo de los campos agrícolas y parte de la clave para la recuperación de ellos podría estar en la microbiota del suelo.

Literatura citada

- Bajželj, B., Richards, K.S., Allwood, J.M., Smith, P., Dennis, J.S., Curmi, E., Gilligan, C.A., 2014. Importance of food-demand management for climate mitigation. *Nat. Clim. Chang.* 4, 924-929.
- Bernard, L., Mougel, C., Maron, P. A., Nowak, V., Lévêque, J., Henault, C., Haichar, F.E.Z., Berge, O., Marol, C., Balesdent, J., Gibiat, F., Lemanceau, P., Ranjard, L., 2007. Dynamics and

- identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ^{13}C -labelled wheat residue as estimated by DNA-and RNA-SIP techniques. *Environ. Microbiol.*, 9, 752-764.
- Bock, E., Koops, H.P., Harms, H., 1986. Cell biology of nitrifying bacteria. In: Prosser, J.I. (Ed.), *Nitrification*. IRL Press, Oxford, pp. 17-38.
- Bremner, J.M., 1996. Nitrogen-Total. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods Part 3*. Soil Science Society of America Inc, American Society of Agronomy, Inc Madison, Wisconsin, USA, pp. 1085-1122.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335-336.
- Carbonetto, B., Rascovan, N., Alvarez, R., Mentaberry, A., Vazquez, M.P., 2014. Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine pampas. *PLoS One* 9, e99949.
- Carvalho, J.L.N., Cerri, C.E.P., Feigl, B.J., Piccolo, M.C., Godinho, V.P., Cerri, C.C., 2009. Carbon sequestration in agricultural soils in the Cerrado region of the Brazilian Amazon. *Soil Tillage Res.* 103, 342-349.
- Ceja-Navarro, J.A., Rivera, F.N., Patiño-Zúñiga, L., Govaerts, B., Marsch, R., Vila-Sanjurjo, A., Dendooven, L., 2010. Molecular characterization of soil bacterial communities in contrasting zero tillage systems. *Plant Soil*, 329, 127-137.

- Chaudhry, V., Rehman, A., Mishra, A., Chauhan, P., Nautiyal, C., 2012. Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microb. Ecol.* 64, 450-460.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., 2005. Exploring microbial diversity a vast below. *Science*, 309, 1331-1333.
- Diacono, M., Montemurro, F., 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 401-422.
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 26, 2460-2461.
- Ehigiator, O.A., Anyata, B.U., 2011. Effects of land clearing techniques and tillage systems on runoff and soil erosion in a tropical rain forest in Nigeria. *J. Environ. Manage.* 92, 2875-2880.
- El Zahar Haichar, F., Achouak, W., Christen, R., Heulin, T., Marol, C., Marais, M.F., Mougel, C., Ranjard, L., Balesdent, J., and Berge, O., 2007. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* 9, 625-634.
- Ferrenberg, S., O'Neill, S.P., Knelman, J.E., Todd, B., Duggan, S., Bradley, D., Robinson, T., Schmidt, S.K., Townsend, A.R., Williams, M.W., Cleveland, C.C., Melbourne, B.A., Jiang, L., Nemergut, D.R., 2013. Changes in assembly processes in soil bacterial communities following a wildfire disturbance. *ISME J.* 7, 1102-1111.
- Gee, G.W., Bauder, J.W., 1986. Particle-size analysis, in: Klute A. (Ed.) *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods.* Soil Science Society of America Inc, American Society of Agronomy, Inc Madison, Wisconsin, USA, pp. 383-411.
- Ghosh, S., Lockwood, P., Daniel, H., Hulugalle, N., King, K., Kristiansen, P., 2011. Changes in Vertisol properties as affected by organic amendments application rates. *Soil Use Manag.* 27, 195-204.

- Gibbs, H.K., Ruesch, A.S., Achard, F., Clayton, M.K., Holmgren, P., Ramankutty, N., Foley, J.A., 2010. Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 16732-16737.
- Govaerts, B., Verhulst, N., Castellanos-Navarrete, A., Sayre, K.D., Dixon, J., Dendooven, L., 2009. Conservation agriculture and soil carbon sequestration: between myth and farmer reality. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 28, 97-122.
- Hall, G.H., 1986. Nitrification in lakes, in: Prosser, J.I. (Ed.), *Nitrification*. IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 127-156.
- Hamza, M.A., Anderson, W.K., 2005. Soil compaction in cropping systems - A review of the nature, causes and possible solutions. *Soil Till. Res.* 82, 121-145.
- Hartmann, M., Niklaus, P.A., Zimmermann, S., Schmutz, S., Kremer, J., Abarenkov, K., Luscher, P., Widmer, F., and Frey, B., 2014, Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction, *ISME J.*, 8, 226–44.
- Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., Saunders, J.R., 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1147-1153.
- Hobbs, P.R., Sayre, K., Gupta, R., 2008. The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. *Proc. Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 363, 543-555.
- Hofman, C.S., Winston, F., 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.
- IUSS Working Group WRB, 2007. World reference base for soil resources 2006, first update 2007. World soil resources reports no. 103. FAO, Rome, p. 128.
- Kladivko, E.J., 2001. Tillage systems and soil ecology. *Soil Till. Res.*, 61(1), 61-76.

- Kottek, M., J. Grieser, C. Beck, B. Rudolf, F. Rubel, 2006. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol. Z.*, 15, pp. 259-263.
- Lee, C.G., Watanabe, T., Sato, Y., Murase, J., Asakawa, S., Kimura, M., 2011. Bacterial populations assimilating carbon from ¹³C labelled plant residue in soil: analysis by DNA-SIP approach. *Soil Biol. Biochem.* 43, 814-822.
- Li, C., Yan K., Tang L., Jia, Z., Li, Y., 2014. Change in deep soil microbial communities due to long-term fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 75, 264-272.
- Li, Y., Lee, C.G., Watanabe, T., Murase, J., Asakawa, S., Kimura, M., 2011. Identification of microbial communities that assimilate substrate from root cap cells in an aerobic soil using a DNA-SIP approach. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1928-1935.
- Marles-Wright, J., Lewis, R.J., 2007. Stress responses of bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 755-60.
- Manzoni, S., Schimel, J.P., Porporato, A., 2012. Responses of soil microbial communities to water stress: Results from a meta-analysis. *Ecology* 93(4), 930–938.
- McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., De Santis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., Hugenholtz, P., 2012. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6, 610-618.
- Navarro-Noya, Y.E., Gómez-Acata, S., Montoya-Ciriaco, N., Rojas-Valdez, A., Suárez-Arriaga, M.C., Valenzuela-Encinas C., Jiménez-Bueno, N., Verhulst, N., Govaerts, B., Dendooven, L., 2013. Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 65, 86-95.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G. and Renella, G., 2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655–670.
- Obade, V. de P., Lal, R., 2014. Soil quality evaluation under different land management practices. *Environ. Earth. Sci.* 72, 4531-4549.

- Paredes Junior, F.P., Portilho, I.I.R., Mercante, F.M., 2015. Microbiological attributes of the soil under cultivation of sugar cane with and without burning straw. *Semina: Ciências Agrárias (Londrina)* 36, 151-163.
- Pascualt, N., Ranjard, L., Kaisermann, A., Bachar, D., Christen, R., Terrat, S., O. Mathieu, J. Lévêque, C. Mougel, C. Henault, P. Lemanceau, M. Péan, S. Boiry, S. Fontaine, P.-A. Maron, 2013. Stimulation of different functional groups of bacteria by various plant residues as a driver of soil priming effect. *Ecosystems*, 16, 810-822.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010. FastTree 2-Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS One*. 5, e9490.
- Powlson, D.S., Bhogal, A., Chambers, B.J., Coleman, K., Macdonald, A.J., Goulding, K.W.T., Whitmore, A.P., 2012. The potential to increase soil carbon stocks through reduced tillage or organic material additions in England and Wales: a case study. *Agric. Ecosyst. Environ.* 146, 23-33.
- Raiesi, F., Beheshti, A., 2015. Microbiological indicators of soil quality and degradation following conversion of native forests to continuous croplands. *Ecol. Indic.* 50, 173-185.
- Ramankutty, N., Evan, A.T., Monfreda, C., Foley, J.A., 2008. Farming the planet: 1: Geographic distribution of global agricultural lands in the year 2000. *Glob. Biogeochem. Cycle.* 22, GB1003.
- Ramírez-Villanueva, D.A., Bello-López, J.M., Navarro-Noya, Y.E., Luna-Guido, M., Verhulst, N., Govaerts, B., Dendooven, L., 2015. Bacterial community structure in maize residue improved soil with contrasting management practices. *App. Soil Ecol.* 86, 62-70.
- Rappé, M.S. and Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of microbiology*, 57, 369-394.

- Resck, D.V.S., Vasconcellos, C.A., Vilela, L., Macedo, M.C.M., 1999. Impact of conversion of brazilian cerrados to cropland and pastureland on soil carbon pool and dynamics. *Global climate change and tropical ecosystems. Adv. Soil Sciences. CRC Press, Boca Raton, FL, 169-196.*
- Reeder, J., Knight, R., 2010. Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. *Nat. Methods* 7, 668-669.
- Rey Benayas, J.M., Bullock, J., 2012. Restoration of biodiversity and ecosystem services on agricultural land. *Ecosystems* 15, 883-899.
- Rezapour, S., Taghipour, A., Samadi, A., 2013. Modifications in selected soil attributes as influenced by long-term continuous cropping in a calcareous semiarid environment. *Nat. Hazards* 69, 1951-1966.
- Rhoades, J.D., Manteghi, N.A., Shouse, P.J. and Alves, W.J., 1989. Estimating soil salinity from saturated soil-paste electrical conductivity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 428-433.
- Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AK, Kent AD, Daroub SM, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW, 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* 1:283–290.
- Rosch, C., Bothe, H., 2005. Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *App and Environ Microbiol.* 71, 2026-2035.
- Sambrook, J., Rusell, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.*
- SAS Institute, 1989. *Statistic Guide for Personal Computers. Version 6.0. (Ed). SAS Institute, Cary.*
- Schlesinger, W.H., 2000. Carbon sequestration in soils: some cautions amidst optimism. *Agr Ecosyst Environ.* 82, 121–127.

- Semenov, A.V., Silva, M.C.P., Szturc-Koestsier, A.E., Schmitt, H., Salles, J.S., van Elsas, J.D., 2012. Impact of incorporated fresh ¹³C potato tissues on the bacterial and fungal community composition of soil. *Soil Biol. Biochem.* 49, 88-95.
- Shah, V., Shah, S., Kambhampati, M.S., Ambrose, J., Smith, N., Dowd, S.E., McDonnell, K.T., Panigrahi, B., Green, T., 2011. Bacterial and Archaea community present in the Pine Barrens Forest of Long Island, NY: unusually high percentage of ammonia oxidizing bacteria. *PLoS One.* 6:e26263.
- Steiner, A.A., 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil* 15, 134–154.
- Soil Survey Staff, 2003. *Keys to Soil Taxonomy*. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, Washington, p 332.
- Sul, W.J., Asuming-Brempong, S., Wang, Q., Tourlousse, D.M., Penton, C.R., Deng, Y., Rodrigues, J.L.M., Adiku, S.G.K., Jones, J.W., Zhou, J., Cole, J.R., Tiedje, J.M., 2013. Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon. *Soil Biol. Biochem.* 65, 33-38.
- Tellez-Rio, A., García-Marco, S., Navas, M., López-Solanilla, E., Tenorio, J.L., Vallejo, A., 2015. N₂O and CH₄ emissions from a fallow-wheat rotation with low N input in conservation and conventional tillage under a Mediterranean agroecosystem. *Sci. Total Environ.* 1, 85-94.
- Thomas, G.W., 1996. Soil pH and Soil Acidity, in: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnston, C.T., Sumner, M.E. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 3. Chemical Methods*. Soil Sci. Soc. of America, Madison, WI, pp. 475-490.
- Thomson, B.C., Ostle, N.J., McNamara, N.P., Oakley, S., Whiteley, A.S., Bailey, M.J., Griffiths, R.I., 2013. Plant soil interactions alter carbon cycling in an upland grassland soil. *Front. Microbiol.* 4, 1-12.

- Tripathi, B.M., Kim, M., Singh, D., Lee-Cruz, L., Lai-Hoe, A., Ainuddin, A.N., Go, R., Rahim, R.A., Husni, M.H.A., Chun, J., Adams, J.M., 2012. Tropical soil bacterial communities in Malaysia: pH dominates in the Equatorial Tropics too. *Microb. Ecol.* 64, 474-484.
- Tscharntke, T., Klein, A. M., Kruess, A., Steffan-Dewenter, I. and Thies, C., 2005. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity – ecosystem service management. *Ecology Letters*, 8, 857–874.
- Verhulst, N., Deckers, J., Govaerts, B., 2009. Classification of the soil at CIMMYT's experimental station in the Yaqui Valley near Ciudad Obregón, Sonora, Mexico. CIMMYT report. CIMMYT, Mexico.
- Verhulst, N., Kienle, F., Sayre, K.D., Deckers, J., Raes, D., Limón-Ortega, A., Tijerina-Chávez, L., Govaerts, B., 2011. Soil quality as affected by tillage-residue management in a wheat-maize irrigated bed planting system. *Plant Soil* 340, 453-466.
- Virto, I., Imaz, M.J., Enrique, A., Hoogmoed, W., Bescansa, P., 2007. Burning crop residues under no-till in semi-arid land, Northern Spain-effects on soil organic matter, aggregation, and earthworm populations. *Soil Res.* 45, 414-421.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microb.* 73, 5261-5267.
- Xiong, J.B., Liu, Y.Q., Lin, X.G., Zhang, H.Y., Zeng, J., Hou, J.Z., Yang, Y.P., Yao, T.D., Knight, R., Chu, H.Y., 2012. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. *Env. Microb.* 14, 2457-2466.
- Xue, L., Li, Q., Chen, H., 2014. Effects of a wildfire on selected physical, chemical and biochemical soil properties in a *Pinus massoniana* forest in South China. *Forests*, 5, 2947-2966.

