



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

Del Instituto Politécnico Nacional

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

“Análisis molecular del efecto de diferentes prácticas agrícolas sobre la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas del suelo durante un ciclo de cultivo”

Tesis

Que para obtener el grado de Doctor en ciencias

presenta:

Edson Augusto Romero Salas, M. en C.

Directores:

Luc Dendooven

Yendi E. Navarro Noya.

Febrero de 2021

El sustentante con CVU 369791 agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 246645, otorgada para realizar sus estudios de Doctorado.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología de Suelos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV- Zacatenco), con el apoyo de los proyectos “Fondo Sectorial de Investigación para la educación SEP-CONACYT, número de proyecto: 252080” e “Infraestructura 205945”. Bajo la dirección del Dr. Luc Dendooven y la Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya.

Índice

Abstract	viii
Resumen	ix
1. Introducción	1
1.1 El suelo	1
1.2 Agricultura	1
1.3 Características del suelo como indicadores de la calidad de un agroecosistema	3
1.4 Agricultura de conservación	4
1.5 La comunidad bacteriana y los suelos agrícolas	6
2. Antecedentes	9
3. Justificación	12
4. Objetivos	13
4.1 Objetivo general	13
4.2 Objetivos específicos	13
5. Hipótesis	14
6. Materiales y métodos	15
6.1 Descripción de la zona de muestreo, campo experimental	15
6.2 Diseño de los tratamientos en campo	16
6.3 Muestreo y análisis fisicoquímico del suelo	17
6.4 Extracción de DNA de los suelos	19
6.5 Identificación molecular por PCR	20
6.6 Construcción de librerías para secuenciación	20
6.7 Análisis de las secuencias	21
6.8 Análisis bioinformático y estadístico de los resultados	21
7. Resultados	22
7.1 Características del suelo	22
7.2 Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana a través del tiempo	26
7.3 La estructura de la comunidad bacteriana y las prácticas agrícolas	35
8. Discusión	36
8.1 Análisis fisicoquímicos	36
8.2 Phyla dominantes	38
8.3 Cambios en las poblaciones de los diferentes tratamientos	39
8.4 Cambios en las poblaciones a través del tiempo	40

9. Conclusiones	43
10. Referencias	44
11. Apéndice	61

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama general de trabajo.	15
Figura 2. Localización del sitio de muestreo, CIMMYT Int. El Batán, Texcoco; vista satelital tomada de Google Maps ® 2016.	16
Figura 3. Diagrama de la colecta de muestras.	18
Figura 4. Un ciclo de cultivo en el campo experimental D5 en El Batán (Texcoco, Estado de México).	18
Figura 5. Precipitación pluvial (las barras representan los mm) y promedio de contenido de agua del suelo (g kg^{-1} , representado por los puntos) en el campo experimental D5 en El Batán (Texcoco, Estado de México).	23
Figura 6. Características fisicoquímicas del suelo: a) Contenido de agua WC (g kg^{-1}), b), carbono orgánico total (g kg^{-1}), c)pH y d) conductividad electrolítica (dS m^{-1}) en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz (<i>Zea mays</i> L.) y residuos removidos (r, CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) y retención de residuos (¢, CTRK) labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (£, CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (□, ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (□, ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán.	24
Figura 7. Concentración de nitrógeno inorgánico en el suelo: a) Amonio ($\text{g NH}_4^+ \text{-N kg}^{-1}$), b) nitrito ($\text{g NO}_2^- \text{-N kg}^{-1}$) y c) nitrato ($\text{g NO}_3^- \text{-N kg}^{-1}$) en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (r, CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (¢, CTRK) labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (£, CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (□, ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (□, ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán.	25
Figura 8. Curvas de rarefacción del número de secuencias versus el número de OTUs en los diferentes días de colecta (n=18).	26
Figura 9. a) Índice de diversidad de Shannon, b) índice de diversidad de Chao1, c) índice de diversidad de Simpson y d) índice de cobertura de Good, para los suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (r, CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (¢, CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (£, CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (□, ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (□, ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán.	27
Figura 10. Heatmap con las abundancias relativas de los diferentes phyla bacterianos en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos	

(CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 diciembre de 2017, en El Batán. 28

Figura 11. Heatmap con la abundancia relativa de los géneros bacterianos más abundantes, en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán. 29

Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) para a) la abundancia relativa de los phyla bacterianos, b) los 50 géneros bacterianos más abundantes, c) todos los grupos bacterianos asignados a nivel de género, d) todos los ordenes bacterianos, e) los 50 OTUs bacterianos más abundantes y f) todos los OTUs de los suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (r, CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (ç, CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (£, CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (□, ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (□, ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán. La imagen se muestra como la arroja el software. 31

Figura 13. Heatmap de la correlación entre las características del suelo EC, TOC, WC, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y la abundancia relativa de a) los phyla bacterianos y b) los 50 géneros más abundantes en los suelos de El Batán. Los dendrogramas fueron construidos con los valores Booleanos utilizando la librería FactoMineR en R. Se utilizó el algoritmo random Forest en R, para buscar un posible efecto de las características del suelo (EC, TOC, WC, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) y los tratamientos sobre la abundancia relativa de los diferentes grupos bacterianos. 32

Figura 14. Análisis de componentes canónicos (CAP) de los phyla bacterianos de suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (r, CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (ç, CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (£, CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (□, ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (□, ZTRR), y las características del suelo, contenido de agua (WC), carbono orgánico total (TOC), pH, conductividad electrolítica (EC), amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). 33

Figura 15. Análisis de componentes canónicos (CAP) de los 50 géneros bacterianos más abundantes en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (r, CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (ç, CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (£, CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (□, ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (□, ZTRR), y de las características del suelo, contenido de agua (WC), carbono orgánico total (TOC), pH, conductividad electrolítica (EC), amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). 34

Figura 16. Análisis de componentes canónicos (CAP), de las características del suelo (EC, TOC, WC, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) y a) los phyla bacterianos, b) los 50 géneros bacterianos más abundantes de los suelos bajo labranza convencional,

monocultivo de maíz y residuos removidos (r, CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (ç, CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (£, CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (□, ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (□, ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán. La gráfica se muestra como la arroja el software. 36

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de los tratamientos en campo.	17
Tabla 2. Clasificación textural del suelo en el campo experimental D5 en El Batán (Texcoco, Estado de México).	23
Tabla 3. Características del suelo en el campo experimental D5 en El Batán (Texcoco Estado de México).	25
Tabla 4. Efecto del tiempo, tratamiento y su interacción, labranza, manejo de residuos y su interacción, y rotación de cultivo sobre la estructura de la comunidad bacteriana considerando todos los phyla, todos los grupos asignados a nivel de género y todos los OTUs (Operational Taxonomic Units).	30
Tabla 5. Efecto del tiempo y tratamiento sobre la estructura de la comunidad bacteriana.	35

Abstract

A variety of studies have shown that agricultural practices and changes in soil conditions, such as water content, inorganic nitrogen concentration, temperature, pH and organic material availability, affect the bacterial community structure. Soil characteristics and the bacterial community structure were monitored over crop cycle in soil under five different treatments, including: soil with maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) rotation, zero tillage and crop residue kept (ZTRK) or removed (ZTRR), and conventional tillage with monoculture maize (CTMR) or maize-wheat rotation and crop residue removed (CTRR) or kept in the field and ploughed in (CTRK). The total organic carbon (TOC) content was significantly affected by tillage practices and ZTRK treatment had the highest concentration compared with the rest of the treatments, whilst CTMR had the lowest TOC concentration. Water content and NO_3^- concentration showed large fluctuations over the crop cycle but were not affected significantly by agricultural practices. The bacterial community structure showed large changes over the crop cycle determined by varying soil characteristics, mostly water content and NO_3^- concentration, which affected majorly to *Achromobacter*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Kaistobacter*, *Pseudomonas* and *Serratia*, while changes due to agricultural practices were much smaller.

Resumen

Diversos estudios han demostrado que las prácticas agrícolas y los cambios en el suelo, como el contenido de agua, concentración de nitrógeno inorgánico, temperatura, pH y disponibilidad de materia orgánica, afectan la estructura de la comunidad bacteriana. Las características del suelo y la estructura de la comunidad bacteriana fueron monitoreadas en suelos bajo cinco diferentes tratamientos que incluyeron: labranza cero, rotación de cultivos con maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) y retención de residuos (ZTRK) o remoción de residuos (ZTRR). Y labranza convencional con monocultivo de maíz (CTMR) o rotación de maíz y trigo, y remoción de residuos (CTRR), o con retención de residuos (CTRK). El carbono orgánico total (TOC) fue afectado significativamente por la labranza, de tal forma que el tratamiento ZTRK tuvo una mayor concentración comparado con el resto de los tratamientos, mientras que el tratamiento CTMR presentó la menor concentración de TOC. El contenido de agua y la concentración de NO_3^- tuvieron grandes fluctuaciones a lo largo del ciclo de cultivo, pero no hubo un efecto significativo por las prácticas agrícolas. La estructura de la comunidad bacteriana tuvo grandes cambios a lo largo del ciclo de cultivo, determinados por las variaciones en las características del suelo, principalmente el contenido de agua y la concentración de NO_3^- afectando particularmente a los géneros *Achromobacter*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Kaistobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*, mientras que los cambios debidos a las prácticas agrícolas fueron menos evidentes.

1. Introducción

1.1 El suelo

El suelo es la capa más externa de la litósfera terrestre, producto de la temperización del material parental (roca madre). Es un ambiente heterogéneo compuesto por una mezcla organizada de minerales, agua, aire y materia orgánica que sirve como soporte para la vida de diversos organismos (Arrouays *et al.*, 2014). La organización estructural edáfica forma estratos llamados horizontes, siendo el horizonte 0 el más superficial, constituido principalmente por materia orgánica en descomposición. El horizonte A es una mezcla de partículas minerales y materia orgánica, el B de arcillas de hierro y/o aluminio y carbono, el C está compuesto principalmente de lixiviados; y el R es donde se encuentra el material parental (IUSS, Working Group, 2015).

El horizonte 0 se considera un hábitat biológicamente activo ya que sustenta el crecimiento y desarrollo vegetal de los diferentes ecosistemas terrestres, y alberga una gran diversidad de organismos como artrópodos, nematodos, bacterias, hongos y arqueas (Brevik *et al.*, 2016). Las comunidades microbianas en el suelo participan en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, fósforo, azufre, carbono, etc., permitiendo el reciclaje y flujo de minerales (Maron *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2014). También participan en la degradación de la materia orgánica y en la eliminación de contaminantes (Gil-Sotres *et al.* 2005; Hobara *et al.*, 2014).

1.2 Agricultura

La agricultura, etimológicamente “cultivo de la tierra”, de acuerdo con la FAO (Food and Agriculture Organization for United Nations) es un conjunto de actividades y conocimientos desarrollados por el hombre para el manejo de los suelos, con la finalidad de producir alimentos. La agricultura implica la modificación del medio ambiente para favorecer la plantación, producción y cosecha de diferentes productos vegetales. Se piensa que se desarrolló en diferentes partes del mundo alrededor de 8,000 a 12,000 años atrás, en diversos puntos del planeta y casi de manera simultánea (Martin y Sauerborn, 2013). Se estima que durante la primera década del siglo XXI el 40% de la

superficie del suelo terrestre era utilizado para la agricultura (Ramankutty *et al.*, 2008). En América Central, México es considerado el centro de domesticación del maíz (*Zea mays* L.), además de variedades de otros cultivos como chile, frijol, algodón y aguacate (Balter, 2007; Martin y Sauerborn, 2013).

La actividad humana para mejorar la productividad agrícola se ha valido de prácticas que, por un lado son efectivas para optimizar la producción y calidad de las cosechas, pero también han sido poco amigables con el medio ambiente y han causado severas perturbaciones a los ecosistemas (Hamza y Anderson, 2005). La creciente demanda de alimentos y biocombustibles ha provocado la deforestación de diferentes ecosistemas, transformándolos en suelos agrícolas también llamados sistemas agrícolas (Gibbs *et al.*, 2010). Los cambios antropogénicos del suelo han sido complejos y de diversa magnitud en escalas temporales y espaciales (Homburg y Sandor, 2011). Se considera que los sistemas agrícolas son los ambientes terrestres artificiales que han sufrido alteraciones debido al efecto de tecnología de diversa índole, enfocada a mejorar la producción agrícola (Vandermeer y Perfecto, 2007). Sin embargo, para comprender la dinámica de estos ambientes es necesario determinar el impacto de la actividad antropogénica sobre los suelos y cómo es que se llevan a cabo las diferentes interacciones ecológicas en este tipo de ecosistemas (Bull *et al.*, 2001; Egli *et al.*, 2013).

La agricultura altera las características fisicoquímicas del suelo por efecto de diferentes factores como el clima, la topografía y la naturaleza de la roca madre (Zalidis *et al.*, 2002), el uso de fertilizantes y/o pesticidas, y la contaminación atmosférica, entre otros, lo que ocasiona la degradación del suelo (Homburg y Sandor, 2011; Sun *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2010). Diversos estudios han puesto en evidencia cómo la actividad agrícola impacta sobre las comunidades microbianas del suelo cambiando su estructura, la riqueza y abundancia de especies, y en algunas ocasiones alterando sus nichos ecológicos y su participación en los ciclos biogeoquímicos (Chaudhry *et al.*, 2012; Wagg *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Schloter *et al.*, 2018).

Los sistemas agrícolas de explotación intensiva, basados en la mecanización y fertilización química han tenido un gran éxito en el incremento en la producción de cultivos, sin embargo, son altamente dañinos al ambiente (Foley *et al.*, 2005; Renard *et*

al., 2013) ya que contribuyen a la eutrofización de los ecosistemas, y a la larga, se requiere aumentar el consumo de fertilizantes, afectando también a sus características fisicoquímicas (Tilman *et al.*, 2002)

1.3 Características del suelo como indicadores de la calidad de un agroecosistema

La calidad de un sistema agrícola generalmente se asocia con su capacidad de producción de cultivos, sin embargo, es difícil determinar el grado de explotación de los suelos agrícolas considerando un único factor (Lal, 1997; Squire *et al.*, 2015). Es por lo que se ha propuesto determinar la calidad de los suelos agrícolas con base en sus propiedades físicas y químicas, ya que estas características pueden alterar la disponibilidad de nutrientes y por lo tanto, el desarrollo de los cultivos (Gil-Sotres *et al.* 2005; Shukla *et al.*, 2006), entre las que destacan: pH, contenido de materia orgánica, textura y conductividad electrolítica, entre otras.

pH

Como indicador de la calidad del suelo, se asocia con la producción y rendimiento de los cultivos. Los efectos negativos de la acidez del suelo no se atribuyen directamente al exceso de H^+ , sino a una alta concentración de Al^{+3} y Mn^{+2} que provienen principalmente de la intemperización de la roca madre, o bien, una deficiencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} , producto de la degradación de la materia orgánica. También puede ser atribuida al exceso de fósforo (Lladó *et al.*, 2018).

Materia orgánica

Las plantas son las principales responsables de la incorporación de carbono orgánico al suelo, ya sea por los residuos como la hojarasca o por actividad e influencia de su sistema radicular. Los residuos vegetales con una baja cantidad de lignina y una baja tasa C:N son fácilmente degradados, lo que libera cationes intercambiables que compiten con por los sitios de intercambio en la superficie de las partículas minerales del suelo y en la materia orgánica (humus estable), lo que resulta en un bajo nivel de acidez. Los exudados radiculares contienen polisacáridos y proteínas que interactúan

con las partículas del suelo formando agregados. La materia orgánica en el suelo entra en un proceso continuo de descomposición y síntesis (humificación), que libera energía y nutrientes que pueden ser aprovechados por las plantas y los microorganismos (Lhemann y Kleber, 2015; Lladó *et al.*, 2018).

Textura

La fracción mineral del suelo está constituida por partículas de diferentes tamaños: arenas (200 a 20 μm), limos (< 20 a 2 μm) y arcillas (<2 μm) y la cantidad de cada una de estas partículas varía en cada suelo, dependiendo del material parental, ya que es producto del intemperismo de las rocas. La textura del suelo determina el número y tamaño de los poros, que a su vez determinan el flujo de agua y gases (IUSS, Working Group, 2015), favoreciendo o no, el establecimiento de los cultivos y los microorganismos (Lüneberg *et al.*, 2018).

Contenido de agua

Los cambios en el contenido de agua pueden afectar a otros parámetros, como la conductividad electrolítica. Un aumento en el contenido de agua del suelo facilita la movilización de sustratos solubles, mientras que una disminución conlleva a la acumulación de sales. La disrupción de los agregados del suelo por efecto de la labranza disminuye el tamaño de los poros, disminuyendo la tasa de infiltración y limitando el intercambio gaseoso, afectando el desarrollo de los organismos aerobios presentes (Lüneberg *et al.*, 2018; Prince *et al.*, 2020).

La agricultura de conservación (AC) propone la implementación de estrategias que permitan preservar las buenas características físicas, químicas y biológicas del suelo, para una buena producción agrícola (Dendooven *et al.*, 2012).

1.4 Agricultura de conservación

La agricultura de conservación busca minimizar el impacto negativo del manejo intensivo del suelo en los agroecosistemas y se basa en la mínima labranza, la retención

de residuos de la cosecha y la rotación de cultivos, y se ha propuesto como una vía para la sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola (Govaerts *et al.*, 2009b). En las últimas décadas la AC ha sido promovida debido los aspectos positivos que involucra, principalmente el aumento en la producción, reducción en la pérdida de materia orgánica y disminución de la erosión, ya sea eólica o hídrica (FAO, 2001; Thierfelder y Wall, 2010; Powlson *et al.*, 2016).

1.4.1 Labranza

Cuando el suelo es labrado, la materia orgánica del suelo (SOM) queda expuesta a una rápida descomposición, disminuyendo la capacidad amortiguadora del pH del suelo y aumentando la producción de gases de efecto invernadero y la tasa de evaporación de agua (Ogle *et al.*, 2005; Homburg y Sandor, 2011; Datta *et al.*, 2013). En suelos con poca o nula labranza los macroagregados del suelo son más estables comparados con suelos con labranza, debido a lo cuál, en suelos sin labranza la disponibilidad de la materia orgánica está restringida y es poco accesible para una importante fracción de la comunidad microbiana (Christensen, 2001; Lichter *et al.*, 2008). Se ha documentado que en los suelos sin labranza o con labranza reducida se optimizan las interacciones ecológicas entre las plantas, el suelo y los microorganismos, al compararse con prácticas agrícolas convencionales (Marinari *et al.*, 2000; Nivelle *et al.*, 2016), estimulando la actividad microbiana (Mathew *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014).

1.4.2 Retención de residuos del cultivo

Al mantener los residuos de la cosecha en el sistema agrícola aumenta la cantidad de materia orgánica en el suelo (Govaerts *et al.*, 2006). La tasa de descomposición de estos residuos depende de la técnica de labranza, ya que la incorporación de estos en el suelo aumenta su disponibilidad (Drury *et al.*, 2006). La descomposición de los residuos varía significativamente dependiendo del tamaño de las partículas, de su localización y su distribución en el suelo (Alvarado, 2006; Repullo *et al.*, 2012).

1.4.3 Rotación de cultivos

Se presenta como una opción para el control de patógenos en los suelos (Lazarovits, 2010). La implementación de esta práctica se refleja en una disminución de las enfermedades que afectan a los cultivos (Bernard *et al.*, 2012) y de la infestación por insectos y malezas (Plourde *et al.*, 2013).

La labranza mínima, la retención de los tejidos vegetales y la rotación de cultivos, en conjunto, mejoran la estructura del suelo al promover la formación de macro y micro agregados en la capa de 0 a 20 cm. Estos agregados son capaces de estabilizar una gran cantidad de C y N (Bimüller *et al.*, 2016; Hontoria *et al.*, 2016). El uso prolongado de fertilizantes químicos se ha asociado a la pérdida de diversidad microbiana (Sun *et al.*, 2015); De Rosa *et al.* (2016), proponen el uso combinado de fertilizantes químicos y orgánicos, así como la rotación de cultivos, en favor de la producción agrícola y la fertilidad del suelo, ya que se ha observado que el uso controlado de fertilizantes y la irrigación controlada pueden disminuir sustancialmente la pérdida de N por lixiviación y desnitrificación (Li *et al.*, 2016). Es por ello que, en México, desde el 2011 existe una iniciativa del gobierno en la que se fomenta la adopción de la agricultura de conservación en todos los niveles posibles, y en colaboración con el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT (Beuchelt *et al.*, 2015).

1.5 La comunidad bacteriana y los suelos agrícolas

1.5.1 Diversidad del suelo

Se estima que un gramo de suelo contiene alrededor de 1×10^9 células bacterianas pertenecientes a decenas de miles de taxa posibles y casi 2×10^8 hifas fúngicas, además de un cuantioso número de ácaros, nematodos y artrópodos; y en el caso particular de las arqueas, al ser un grupo con nichos más restringidos en ambientes terrestres, no hay estudios que brinden certeza de su abundancia en el suelo. A pesar de esto, la relación entre la estructura de la microbiota del suelo y su nicho en el mismo, siguen sin ser del todo esclarecidas (Wagg *et al.*, 2014). Cuando las condiciones de un microhábitat favorecen el aumento del número de taxa, aumentan las interacciones bióticas, tanto

positivas como negativas: la facilitación de los recursos recalcitrantes, la complementación de nichos y la competencia por recursos, modulando la eficiencia en el aprovechamiento de dichos recursos. También, se ha observado que estas interacciones pueden alcanzar un umbral de saturación al aumentar el número de poblaciones bacterianas capaces de cumplir una misma función, en un ambiente fluctuante, durante largos periodos de tiempo, alcanzando así un estado estable (Yu *et al.*, 2018).

La estructura heterogénea del suelo promueve la diversificación de las poblaciones al fraccionar los recursos y permitir la formación de nichos (Escalante, 2008), asimismo, las comunidades bacterianas pueden ser altamente influenciadas por factores abióticos como el pH, concentración de carbono y otros nutrientes o bien, en el caso de los suelos agrícolas, las bacterias pueden ser estimuladas de forma positiva o negativa en función del manejo del suelo y del tipo de cultivo presente (Li *et al.*, 2014).

1.5.2 Las comunidades bacterianas en el suelo y su importancia

Una comunidad se define como el conjunto de especies que coexisten en un lugar y tiempo determinado (Escalante, 2008). La diversidad de las comunidades bacterianas y su dinámica pueden ser determinantes en la salud del suelo y jugar un papel crucial en el desarrollo óptimo de los cultivos (Garbeva *et al.*, 2004). Como se ha mencionado anteriormente, en los suelos sin labranza o con labranza mínima, existe una mejor interacción microorganismo-suelo-planta, comparado con los suelos bajo prácticas agrícolas convencionales, y se ha demostrado que los microorganismos involucrados de manera activa en los ciclos biogeoquímicos son de gran relevancia en los sistemas agrícolas de explotación a largo plazo (Shi *et al.*, 2012; Nivelles *et al.*, 2016), es por ello que los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana (diversidad de especies, abundancia relativa y su posible función) debido al uso y manejo del suelo son importantes en el estudio de la acumulación de C, emisión de gases de efecto invernadero y restauración de suelos en el actual escenario de cambio climático (Fernandez *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

1.5.3 Las comunidades bacterianas y las perturbaciones del suelo

El proceso mediante el cual las comunidades biológicas se desarrollan a través del tiempo debido a su dinámica interna o bien, a factores externos, se conoce como sucesión ecológica. Una sucesión primaria comienza con la colonización y movilización de nutrientes por una comunidad pionera (Ortiz-Álvarez *et al.*, 2018). Durante las primeras etapas de una sucesión las propiedades edáficas conllevan una débil presión de selección, donde los eventos aleatorios rigen los cambios en la abundancia de las especies. Mientras que en las etapas posteriores de la sucesión, dichos eventos aleatorios pierden fuerza (Dini-Andreote *et al.*, 2015). Sin embargo, las comunidades bacterianas del suelo están sometidas a perturbaciones (alteraciones de las condiciones ambientales debidas a factores bióticos o abióticos) de manera intermitente, como los cambios estacionales, periodos de lluvia y sequía, cambios de temperatura o los periodos de siembra y barbecho, y el desarrollo propio de los cultivos (Zhang *et al.*, 2016; Lüneberg *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Estos cambios pueden propiciar las condiciones para el establecimiento de otras especies, ocasionando un estadio de sucesión secundaria (Goss-Souza *et al.*, 2017; Ortiz-Álvarez *et al.*, 2018). También pueden existir perturbaciones profundas o frecuentes que fragmenten los nichos o microhábitats, exponiendo los recursos y dejándolos a merced de la microbiota existente (Escalante, 2008).

Los cambios del ambiente a causa del manejo del suelo tienen un efecto directo en la comunidad bacteriana. La respuesta de grupos específicos y taxonómicamente diferentes que, con base en su capacidad de adaptación y la disponibilidad de nutrientes, alteran la estructura, composición y diversidad metabólica de dicha comunidad a escala espacial y temporal. En el caso de suelos bajo prácticas de agricultura de conservación, la comunidad bacteriana cuenta con recursos más heterogéneos, lo que promueve ensamblajes por especialización de nichos, estableciendo redes metabólicas que facilitan el acceso a recursos que serían poco accesibles para poblaciones individuales, y donde sólo unas pocas condiciones ambientales ejercen un efecto significativo sobre la comunidad (Kim y Liesack, 2015; Goss-Souza *et al.*, 2017).

La coalescencia comunitaria, un término recientemente acuñado, describe situaciones en las que dos o más comunidades completas interactúan debido a la translocación de fragmentos del suelo. Dicha translocación puede ser ocasionada por diferentes factores o eventos que pueden ocurrir de forma natural, vía interacciones ecológicas (factores intrínsecos), o bien, como resultado de influencias externas o perturbaciones (factores extrínsecos). En ambos casos se involucra a comunidades que se desarrollaron bajo diferentes condiciones y por consiguiente, con diferente composición. Por ejemplo, al romper los agregados del suelo, su interior queda expuesto a una comunidad microbiana muy diferente a la que contenía en su microhábitat. Durante este tipo de eventos la diversidad de la comunidad cambia (aumenta o disminuye) y se generan nuevas interacciones que pueden ser determinantes para el ensamble de la comunidad microbiana a nivel espacial y temporal (Rillig *et al.*, 2016).

En los bosques y ecosistemas prístinos, la mayoría de los miembros de una comunidad microbiana muestran cambios en su abundancia a través del tiempo, así que la ocurrencia de las especies dependerá de si la comunidad objeto de estudio es observada durante una sucesión primaria, una sucesión secundaria o en un estado estable (Dini-Andreote *et al.*, 2015; Shade y Gilbert, 2015; Goss-Souza *et al.*, 2017).

2. Antecedentes

En los primeros tres lustros del siglo veintiuno, una gran variedad de herramientas moleculares ha facilitado profundizar en el conocimiento de la diversidad y composición de las comunidades microbianas presentes en el suelo. Herramientas como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), la identificación del perfil de ácidos grasos (PLFA), y en particular, el análisis metagenómico de los ácidos nucleicos, que ha dado acceso a los genomas de la “mayoría no cultivable”. La obtención de amplicones del gen 16S rRNA (región del genoma que codifica para la síntesis del rRNA 16S) en conjunto con el desarrollo acelerado de la secuenciación masiva, ha permitido el descubrimiento de nuevos phyla, clases, y géneros de microorganismos, ayudando así, a caracterizar y cuantificar la diversidad del suelo, lo que representa una oportunidad sin precedentes para analizar la biodiversidad en diferentes ecosistemas (Nesme *et al.*, 2016).

A continuación se presenta una serie de estudios que, con base en el gran avance de las herramientas moleculares, han ayudado a identificar algunos de los factores capaces de modelar la estructura de las comunidades bacterianas a través del tiempo y del espacio, sentando así las bases para el desarrollo del presente trabajo.

Banning *et al.* (2011) hicieron la caracterización de la comunidad bacteriana y fúngica del suelo de un bosque de eucalipto que estuvo sometido a explotación minera durante 18 años. El análisis de la comunidad bacteriana se realizó con microarreglos del gen 16S rRNA, poniendo a prueba la hipótesis de que, con el paso del tiempo la estructura de la comunidad microbiana se volvería más similar a la de las áreas no explotadas del bosque, y concluyeron que existen patrones predecibles en la estructura de la comunidad bacteriana durante una sucesión secundaria y que la estructura de la comunidad está íntimamente relacionada con diferentes variables edáficas como el pH, y la concentración de C, N y P.

Lauber *et al.* (2013) estudiaron los cambios en la comunidad microbiana de tres diferentes tipos de suelos representados por réplicas de parcelas bajo prácticas de agricultura convencional, agricultura de insumos reducidos y suelo de pastizal, cada mes durante ocho meses. Utilizando pirosecuenciación y “metabarcoding” del gen 16S rRNA, encontraron que los suelos agrícolas y el pastizal albergaban comunidades bacterianas que mostraban patrones temporales distintos, por lo que ellos sugirieron que se debe ser muy cuidadoso cuando se analiza la variabilidad temporal, al comparar la diversidad microbiana entre diferentes tipos de suelos expuestos a las mismas condiciones ambientales.

Figuerola *et al.* (2014) utilizaron secuencias del gen 16S rRNA para estudiar la rotación espacial y la diversidad de la comunidad bacteriana entre suelos agrícolas bajo monocultivo de soya y suelo bajo rotación de cultivos, respecto a suelos de pastizal, en las Pampas argentinas, durante tres ciclos de cultivo (un año y medio), y concluyeron que, la implementación de buenas prácticas de agricultura, a largo plazo, pueden jugar un papel crítico para la conservación de la biodiversidad del suelo.

Ashworth *et al.* (2017) analizaron los cambios de la comunidad bacteriana en respuesta a la secuencia de cultivos y la aplicación de cubiertas de residuos vegetales en campos experimentales sin labranza, utilizando diferentes secuencias de cultivo de maíz, algodón y soya que fueron rotados en etapas de cuatro años, durante un total de 12 años. Encontraron que la riqueza y diversidad cambiaron temporal y espacialmente de acuerdo con los eventos climáticos, la variación de los nutrientes, y en particular la concentración de carbono en el suelo y con el pH, y concluyeron que la adición de nutrientes, la rotación de los cultivos por largos periodos de tiempo y la retención de residuos vegetales en sistemas agrícolas sin labranza puede moldear la estructura de la comunidad bacteriana.

En general, se puede decir que los cambios en los factores abióticos como el pH y la concentración de nutrientes como C y N; así como las fluctuaciones en las condiciones climáticas como la humedad y la temperatura, y la implementación de estrategias para la explotación del suelo, como la rotación de cultivos, el manejo de residuos vegetales y la labranza, podrían dirigir los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana a través del tiempo en los diferentes microhábitats, de una forma dinámica. De tal manera que los grupos bacterianos presentes, aunque con baja abundancia relativa (persistentes) encuentren las condiciones que les permitan aumentar significativamente su población, es decir, se vuelvan prevalentes; o viceversa.

3. Justificación

Uno de los objetivos de la ecología microbiana es comprender los factores que controlan los cambios en la composición y distribución de las comunidades bacterianas para poder realizar proyecciones de los cambios que podría causar el manejo de los suelos agrícolas. Sin embargo, la implementación de dinámicas en condiciones de laboratorio puede dejar de lado algunos factores bióticos y abióticos con un papel activo en el desarrollo de la comunidad bacteriana a través del tiempo.

Para llevar a cabo un estudio ecológicamente significativo dentro de una escala temporal adecuada en campo, la frecuencia y extensión de los muestreos debe tomar en cuenta no solo el tiempo de generación bacteriana, si no también tiempo de desarrollo del cultivo, de tal manera que se pueda observar la rotación de la comunidad bacteriana, así como las fluctuaciones ambientales del ecosistema durante un ciclo de cultivo de maíz.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Conocer el efecto de las prácticas agrícolas contrastantes (convencional y de conservación) sobre la comunidad bacteriana a lo largo del ciclo de producción de maíz, en un campo experimental con riego de temporal.

4.2 Objetivos específicos

Determinar los cambios en los factores fisicoquímicos del suelo de los diferentes tratamientos a lo largo del ciclo de producción del maíz.

Comparar los cambios temporales en la estructura de las comunidades bacterianas del suelo bajo prácticas agrícolas contrastantes.

Dilucidar cuáles de los factores evaluados (tiempo y/o tratamiento) ejercen mayor impacto en las comunidades bacterianas del suelo.

5. Hipótesis

La temporada de lluvias y los cambios en la concentración de nutrientes por efecto del desarrollo del maíz influyen de manera positiva en la diversidad de la comunidad bacteriana, y este efecto es mayor que el efecto que ejercen las diferentes prácticas agrícolas.

6. Materiales y métodos

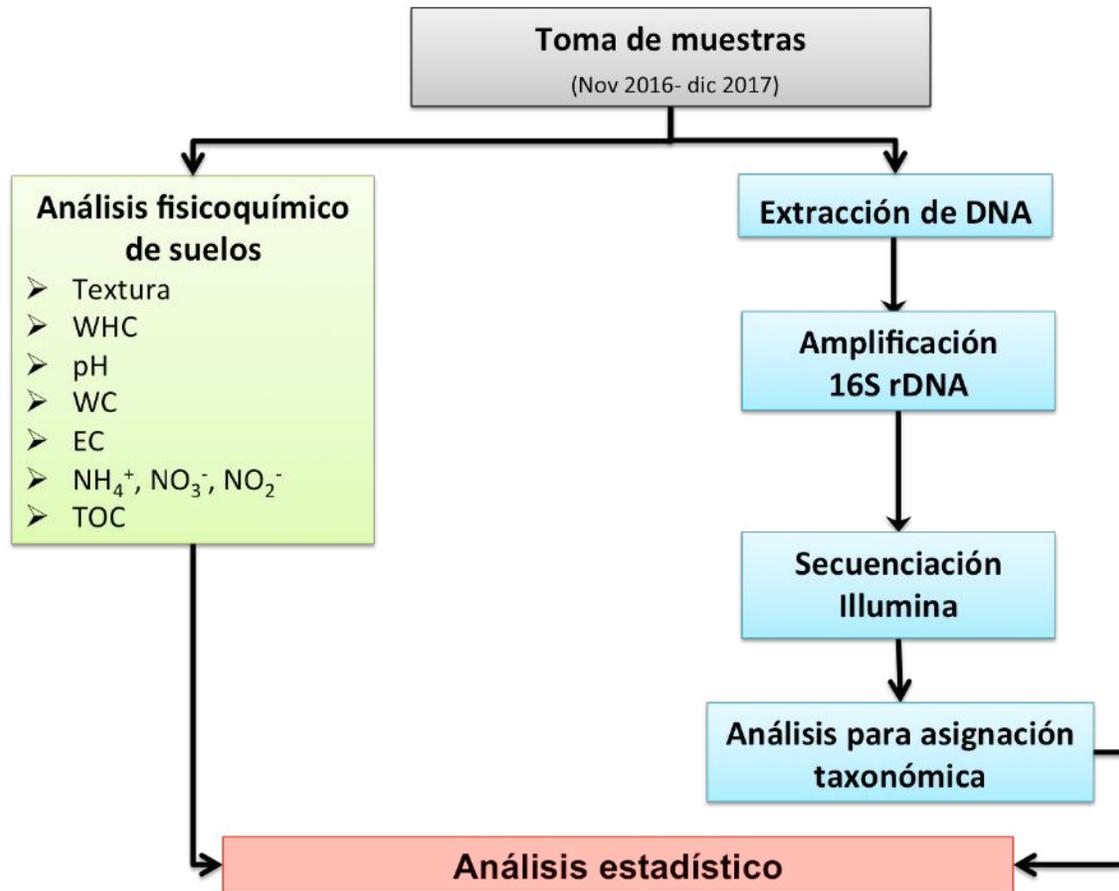


Figura 1. Diagrama general de trabajo.

6.1 Descripción de la zona de muestreo, campo experimental

El sitio de muestreo se encuentra dentro de las instalaciones del centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo (CIMMYT Int.) en El Batán. El Batán está ubicado en el altiplano semiárido subtropical de México (Fig. 2), cerca del exlago de Texcoco, a una altitud de 2240 msnm (19.31°N, 98.50°W). Con una precipitación pluvial anual promedio de 651 mm, de los cuales, 558 mm caen entre los meses de mayo y octubre. Lluvias cortas e intensas seguidas de semanas secas caracterizan esta temporada, con temperaturas anuales promedio de 7° mínima y 24°C máxima (Govaerts *et al.*, 2007). El suelo se clasifica de acuerdo al sistema de referencia mundial (WRB; IUSS Working Group WRB; 2006), como Phaeozem cumulic o Haplustoll cumulic, con base en el sistema taxonómico de suelos de la USDA (Govaerts *et al.*, 2009a).



Figura 2. Localización del sitio de muestreo, CIMMYT Int. El Batán, Texcoco; vista satelital tomada de Google Maps ® 2016.

6.2 Diseño de los tratamientos en campo

Este campo es parte de un experimento a largo plazo que comenzó en 1991 (Govaerts *et al.*, 2008). El resumen de los tratamientos considerados para este trabajo se muestra en la Tabla 1 y consisten en suelos con labranza convencional (CT, conventional tillage), no labranza (ZT, zero tillage), con retención (K, keep) o remoción (R, removed) de residuos en la parcela, además de la rotación anual de los cultivos con maíz (*Zea mays*) y trigo (*Triticum aestivum*) (MW), y monocultivo de maíz (MM). Los tratamientos utilizados para este estudio fueron cultivados con maíz con un rendimiento promedio (kg ha^{-1} y 12% H_2O) de: CTMR 3570 ± 220 , CTRR 4063 ± 388 , CTRK 4403 ± 150 , ZTRR 4339 ± 461 , ZTRK 5285 ± 184 , entre los años 1997-2002 (Govaerts *et al.*, 2005). En el tratamiento de labranza convencional (CT) el rastrojo se retira después de la cosecha; además, para la labranza se utilizó un devastador agrícola con una profundidad de 30 cm, posteriormente se hicieron dos tratamientos con una grada de discos a una profundidad de 20 cm y otros dos con una grada de dientes de 10 cm de profundidad y se utilizó la grada de dientes en caso de control de maleza. Todo el proceso de labranza se hizo antes de la siembra, es decir, en los meses de mayo y diciembre (Ramírez-Villanueva *et al.*, 2015).

Tabla 1. Resumen de los tratamientos en campo.

Tratamiento	Parcelas	Práctica	Labranza	Cultivo	Residuos
CTRK (1)	10 y 40	Convencional	Si	Rotación WM	Retenidos
CTRR (2)	11 y 34	Convencional	Si	Rotación WM	Removidos
ZTRR (3)	13 y 39	Conservación	No	Rotación WM	Removidos
ZTRK (4)	28 y 49	Conservación	No	Rotación WM	Retenidos
CTMR (5)	29 y 51	Convencional	Si	Maíz	Removidos

El número en el paréntesis indica el número del tratamiento en campo.

En los tratamientos sin labranza (ZT) el rastrojo se dejó en la superficie, generando una cubierta uniforme, el control de maleza se llevó a cabo en temporada de sequía aplicando herbicida sólo de ser necesario.

Los cultivos de maíz y trigo comenzaron en la temporada de lluvias (5-15 de junio de 2016) (Govaerts *et al.*, 2008), todos los cultivos fueron fertilizados con urea a una tasa de 150 kg N ha⁻¹. En el caso de trigo se aplicó después de la aparición del primer nodo de la plántula, en el caso de maíz se fertilizó después de la aparición de la quinta o sexta hoja de la planta.

6.3 Muestreo y análisis fisicoquímico del suelo

6.3.1 Toma de muestras

El diseño experimental comprendió dos réplicas por parcela y fue diseñado para estudiar el efecto de las prácticas agrícolas en el rendimiento de los cultivos a largo plazo. El número de réplicas del experimento en campo estuvo en función del espacio y costo del experimento, por lo que el desarrollo experimental en agronomía y agricultura se valió de dos réplicas para reducir costos, permitiendo observar diferencias significativas entre tratamientos (Federer, 1977; Federer y Crossa, 2012).

Se colectaron de 8 a 10 submuestras en puntos aleatorios de la capa más externa del suelo con un sacabocados de 20 cm de longitud y un diámetro interno de 2 cm

(aproximadamente 80 g de suelo cada vez). Las submuestras se mezclaron para obtener una muestra compuesta (aproximadamente de 600 a 800 g de suelo) por parcela para cada tratamiento (dos parcelas por cinco tratamientos) (Ceja-Navarro *et al.*, 2010; Dendooven *et al.*, 2012) (Fig. 3). La colecta de muestras se efectuó una vez al mes durante el periodo de sequía y cada 15 días en periodo de lluvias; para un total de 18 colectas durante todo el ciclo de producción de maíz (Fig. 4).

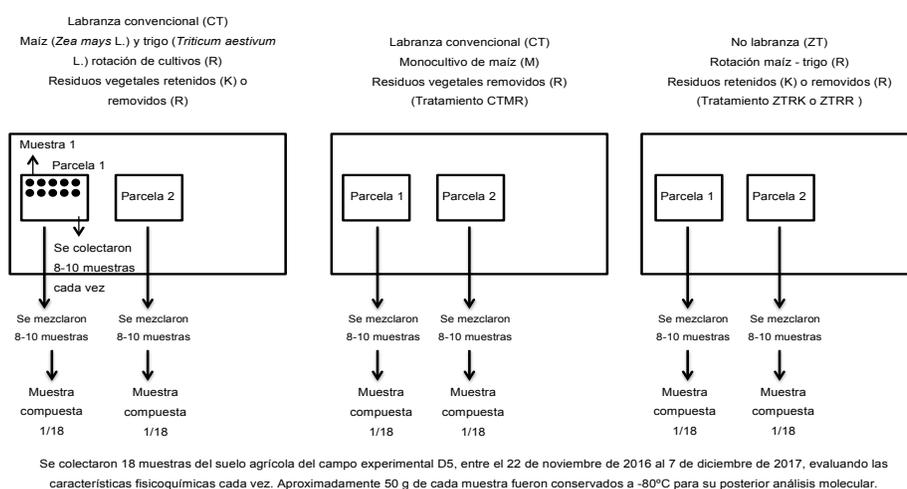


Figura 3. Diagrama de la colecta de muestras.

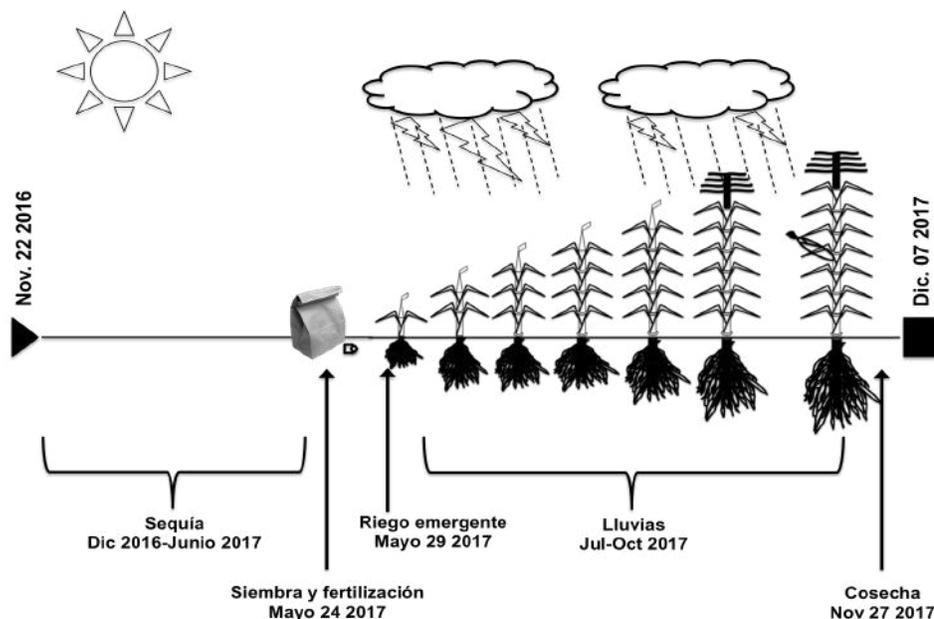


Figura 4. Un ciclo de cultivo en el campo experimental D5 en El Batán (Texcoco, Estado de México).

Las muestras colectadas se transportaron al laboratorio en bolsas de plástico negro y se conservaron en hielo hasta ser procesadas. Cada muestra fue tamizada con una criba de 2 mm. Posteriormente se separaron las muestras para la caracterización fisicoquímica y aproximadamente 50 g se conservaron inmediatamente a -80°C para extracción de DNA.

6.3.2 Caracterización fisicoquímica de los suelos

Se hizo la caracterización fisicoquímica de las diferentes muestras de suelos: cada muestra fue molida y mezclada para posteriormente efectuar los diferentes protocolos de caracterización fisicoquímica que incluyeron la determinación de, humedad relativa (WC, por sus siglas en inglés) (Ruíz-Valdiviezo *et al.*, 2010), capacidad de retención de agua (WHC, por sus siglas en inglés) por el método gravimétrico (Cassel y Nielsen, 1986), conductividad eléctrica (EC, por sus siglas en inglés) con el método de pasta saturada (Rhoades *et al.*, 1989), pH (Thomas, 1996), tamaño de partícula del sedimento (Gee y Bauder, 1986), carbono orgánico total (TOC, por sus siglas en inglés) (Amato, 1983) y nitrógeno mineral en el suelo (NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^-) con el equipo automático San Plus System-SKALAR (USA) (Mulvaney, 1996; Ruíz-Valdiviezo *et al.*, 2010) (Apéndice).

6.4 Extracción de DNA de los suelos

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante tres diferentes protocolos de extracción, utilizando 0.5 g de suelo cada vez. Cada técnica se efectuó por duplicado (1 g de suelo) y se mezcló para obtener finalmente el DNA de 3 g de suelo por muestra. Para eliminar la materia orgánica, a los tubos con 0.5 g de suelo se les agregó 10 ml de pirofosfato de sodio 0.15 M y se agitó en un equipo Vortex hasta resuspender perfectamente, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min y se eliminó el sobrenadante. Este proceso se repitió seis veces, después se lavaron con 10 ml de regulador de fosfatos pH 8 y se agitó con vortex para resuspender, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el lavado cuatro veces (Ceja-Navarro *et al.*, 2010). Después se efectuaron los diferentes protocolos de extracción.

El primer protocolo de extracción fue propuesto por Valenzuela-Encinas *et al.* (2008) y consiste en una lisis química y choque térmico, el segundo protocolo fue propuesto por Hoffman y Winston (1987) y consiste en lisis química por efecto de detergentes, y finalmente, el protocolo propuesto por Sambrook y Russel (2001) que consiste en una lisis enzimática.

Se verificó la calidad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% con TAE 1X usando 3 µl de muestra y 1 µl de regulador de carga y se desarrolló a 80 V, durante 30 min.

6.5 Identificación molecular por PCR

Se amplificó por triplicado para cada muestra la región variable V3–V4 del gen 16S rDNA de bacterias; utilizando los iniciadores 341F (5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3') y 805R (5' GACTACHVGGGTATCTAATCC 3') (Herlemann *et al.*, 2011) con un volumen de 12.5 µL, el tamaño del amplicón obtenido fue verificado con electroforesis en agarosa 1% y usando SyBrGold.

6.6 Construcción de librerías para secuenciación

Se mezclaron los amplicones generados por tres reacciones de PCR de cada muestra para minimizar los sesgos (Ancinas *et al.*, 2004) y se purificaron utilizando el kit DNA Clean and Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. La purificación de los amplicones se comprobó mediante gel de agarosa 1.5% y posteriormente se cuantificaron los amplicones usando PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA): se hizo una dilución 1:50 de la muestra en TE 1X (Tris-EDTA pH8) y se mezcló con volúmenes iguales de PicoGreen 1X, la mezcla se dejó reposar 5 min a 4°C en la oscuridad y se midió en el NanoDrop™ 3300 Fluorespectrometer (Thermo Scientific Nanodrop; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

Se normalizaron y mezclaron los amplicones obtenidos por cada muestra con base en su concentración. La mezcla de amplicones se cuantificó para realizar una segunda PCR

donde se colocó un multiidentificador para secuenciación con la plataforma Illumina 300-bp paired-end (PE) runs MiSeq en Macrogen, Inc. (DNA Sequencing Service, Seúl, Corea del sur).

6.7 Análisis de las secuencias

Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó el software QIIME versión 1.9.1 (<http://www.qiime.org>) (Caporaso *et al.*, 2010b). Se utilizó el método *fastq-join* para el ensamble de secuencias Paired-end. Se hizo el demultiplex de las Trimmed reads y se removieron las secuencias de baja calidad (menos de 19 Phred score) y las quimeras. Se seleccionaron las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) con nivel de similitud de 97% usando la base de datos Greengenes v13_8 con el algoritmo de UCLUST (Edgar 2010). El alineamiento de las secuencias se hizo usando el algoritmo PyNAST, con un umbral de identidad mínima de 75% comparando con la base de datos de Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>) (Caporaso *et al.*, 2010a). La asignación taxonómica se hizo mediante el clasificador del RDP11 (Ribosomal Data Project release 11) (<http://edp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jps>) usando la clasificación Naïve Bayesian con identidad mínima de 80% (Wang *et al.*, 2007). Las matrices de observación biológica (biom) con la asignación taxonómica y los metadatos de las muestras se construyeron de la siguiente manera. Las muestras con menos de 3000 secuencias fueron descartadas de las OTU-biom, y un total de 153 muestras fueron utilizadas para los análisis posteriores. Las OTU-biom fueron rarificadas a una misma profundidad, y utilizadas en el análisis de diversidad alfa, $n= 8,000$ (Gilbert *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2016). Las tablas rarificadas se obtuvieron mediante submuestras consecutivas de la ocurrencia de poblaciones bacterianas para cada muestra a intervalos de 100 secuencias y 3,171 lecturas 50 veces.

6.8 Análisis bioinformático y estadístico de los resultados

Los análisis para calcular los índices de alfa diversidad de Chao1, Shannon y Simpson, se realizaron con la OTU-biom rarificada (Shannon, 1948; Simpson, 1949; Chao, 1984). El índice de cobertura de Good se calculó con la tabla biom de QIIME (Good, 1953; Caporaso *et al.*, 2010b). Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el software R

(R Core Team, 2013). Se hizo un análisis no paramétrico para determinar el efecto de las prácticas agrícolas sobre las características del suelo y la diversidad alfa bacteriana con el t1 way non-parametric test de la paquetería WRS2 (A collection of robust statistical methods) (Mair y Wilcox, 2017). La estructura de la comunidad bacteriana en los diferentes tratamientos fue explorada con un análisis de componentes principales (PCA), mientras que el análisis canónico de coordenadas principales (CAP) fue utilizado para explorar el efecto de las características del suelo sobre la estructura de las comunidades bacterianas. El análisis de varianza permutacional multivariada (perMANOVA) utilizando una prueba de matrices de distancia (usage adonis, method Bray-Curtis) se utilizó para determinar el efecto de las diferentes prácticas agrícolas y el tiempo sobre la estructura de la comunidad bacteriana. Los heatmap fueron elaborados con la paquetería pheatmap (Kolde, 2015). Los coeficientes de correlación de Spearman entre las características del suelo y la abundancia relativa de las diferentes comunidades bacterianas fueron calculados con la paquetería vegan en R (Oksanen *et al.*, 2017). Un efecto probable de las características del suelo (pH, EC, TOC y Ni) y los tratamientos sobre la abundancia relativa de los diferentes grupos bacterianos se exploró con el algoritmo random Forest (Breiman *et al.*, 2015). El mejor subconjunto de variables ambientales con una gama máxima de correlación con las disimilitudes de la comunidad (bioenv) fue utilizado para determinar qué características del suelo explican mejor la estructura de la comunidad bacteriana. Los análisis CAP, PCA, adonis y bioenv fueron efectuados con la paquetería vegan (Oksanen *et al.*, 2017).

7. Resultados

7.1 Características del suelo

La textura del suelo del campo experimental D5 se clasificó como suelo limoso arcilloso (Tabla 2). El contenido de agua del suelo descendió desde el final de la temporada de lluvias en noviembre y hasta marzo (Fig. 5 y Fig. 6a). Permaneciendo $<100 \text{ g kg}^{-1}$ de suelo hasta finales de mayo, e incrementando de nuevo con el inicio de las lluvias en junio (Fig. 6a). Mostrando grandes fluctuaciones como resultado de lluvias erráticas y descendiendo de nuevo en noviembre, con el final de la temporada de

lluvias (Fig. 5). El contenido de agua no se vio afectado por los tratamientos, a lo largo del ciclo de un año completo (Tabla 3).

Tabla 2. Clasificación textural del suelo en el campo experimental D5 en El Batán (Texcoco, Estado de México).

Tratamiento ^a	Fertilizante (kg N ha ⁻¹)	Arcilla			Clasificación USDA
		Arcilla	Limo	Arena	
		(g kg ⁻¹ suelo)			
CTMR	150	220	480	300	Limoso
CTRR	150	200	480	320	Limoso
CTRK	150	190	540	270	Limo arcilloso
ZTRR	150	170	500	330	Limo arcilloso
ZTRK	150	170	560	270	Limo arcilloso

^a La descripción se encuentra en la Tabla 3.

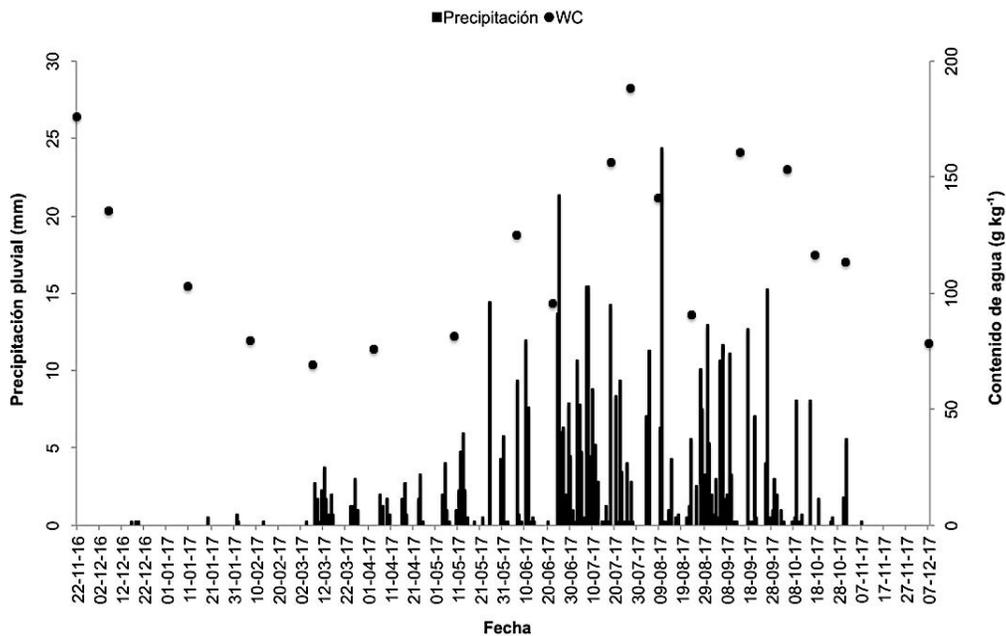


Figura 5. Precipitación pluvial (las barras representan los mm) y promedio de contenido de agua del suelo (g kg⁻¹, representado por los puntos) en el campo experimental D5 en El Batán (Texcoco, Estado de México).

Hubo ligeras variaciones en el carbono orgánico en los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo, excepto en el tratamiento ZTRK, alrededor del 22 de junio (día 198) (Fig. 6b). El contenido de TOC fue significativamente afectado por los diferentes tratamientos en el orden ZTRK>CTRK>CTRR=ZTRR>CTMR (Tabla 3). EL pH del suelo fue ligeramente ácido y mostró fluctuaciones al principio del año (Fig. 6c), pero

no fue afectado de manera significativa por los tratamientos (Tabla 3). La EC disminuyó al principio del experimento y remontó durante la temporada de lluvia, entre julio y agosto, para caer nuevamente al final de la temporada (Fig. 6d). La EC no se afectó de manera significativa por los tratamientos (Tabla 3).

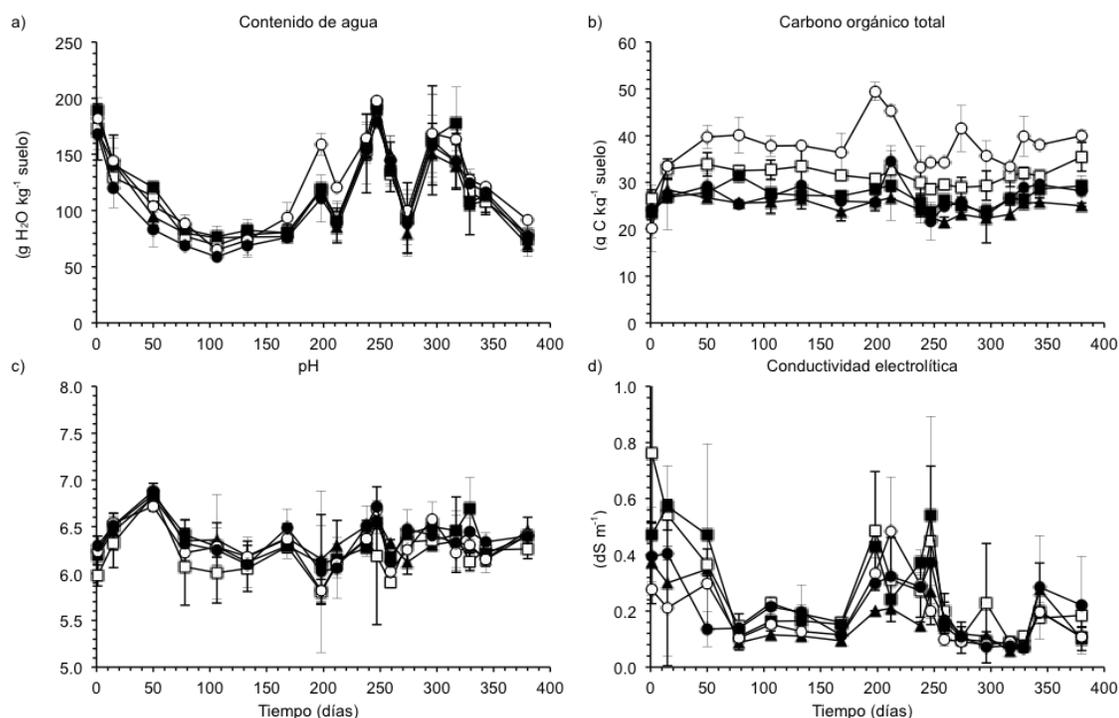


Figura 6. Características fisicoquímicas del suelo: a) Contenido de agua WC (g kg⁻¹), b), carbono orgánico total (g kg⁻¹), c) pH y d) conductividad eléctrica (dS m⁻¹) en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz (*Zea mays* L.) y residuos removidos (Δ , CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo (*Triticum aestivum* L.) y retención de residuos (\blacksquare , CTRK) labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\square , CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (\bullet , ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\circ , ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán.

No hubo un patrón definido en la concentración de NH₄⁺ durante el ciclo de cultivo, fluctuando entre >2 y >50 g N kg⁻¹ (Fig. 7a). La concentración de NO₂⁻ fue baja (< 0.6 mg kg⁻¹ suelo seco) y se volvió indetectable a partir de abril (Fig. 7b). La concentración de NO₃⁻ se incrementó gradualmente a partir de junio, fluctuando bruscamente desde entonces y volviéndose casi indetectable entre agosto y octubre (Fig. 7c). Las concentraciones de NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃⁻ no se afectaron de manera significativa por los tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Características del suelo en el campo experimental D5 en El Batán (Texcoco Estado de México).

Tratamiento ^a	Rotación	Labranza	Residuos	Fertilizante (kg N ha ⁻¹)	pH	EC ^b (dS m ⁻¹)	WC ^c TOC NH ₄ ⁺ NO ₂ ⁻ NO ₃ ⁻ (g kg ⁻¹ Suelo)				
							CTMR	MM ^d	Convencional	Removido	150
CTRR	MW ^g	Convencional	Removido	150	6.4 A	0.250 A	122 A	26.9 C	13.6 A	0.11 A	21.5 A
CTRK	MW	Convencional	Retenido	150	6.2 A	0.278 A	117 A	31.3 B	14.4 A	0.09 A	24.9 A
ZTRR	MW	No labranza	Removido	150	6.4 A	0.215 A	113 A	26.7 C	15.9 A	0.09 A	20.8 A
ZTRK	MW	No labranza	Retenido	150	6.3 A	0.185 A	128 A	37.3 A	14.6 A	0.10 A	14.6 A
F val.					2.33	2.31	0.76	61.06	0.03	0.07	1.32
P val. ^h					0.068	0.071	0.556	<0.001	0.0998	0.991	0.273

^a CTMR: suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz (*Zea mays* L.) y residuos removidos, CTRR: labranza convencional, rotación maíz-trigo (*Triticum aestivum* L.) y residuos removidos, CTRK: labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos, ZTRR: no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos y ZTRK: no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos, ^b EC: conductividad electrolítica, ^c contenido de agua, ^d monocultivo de maíz, ^e no diferencia significativa entre tratamientos, ^f valores con la misma letra no presentan diferencia significativa, ^g MW rotación maíz-trigo, ^h *Non parametric analysis T1way* en R con la librería WRS2.

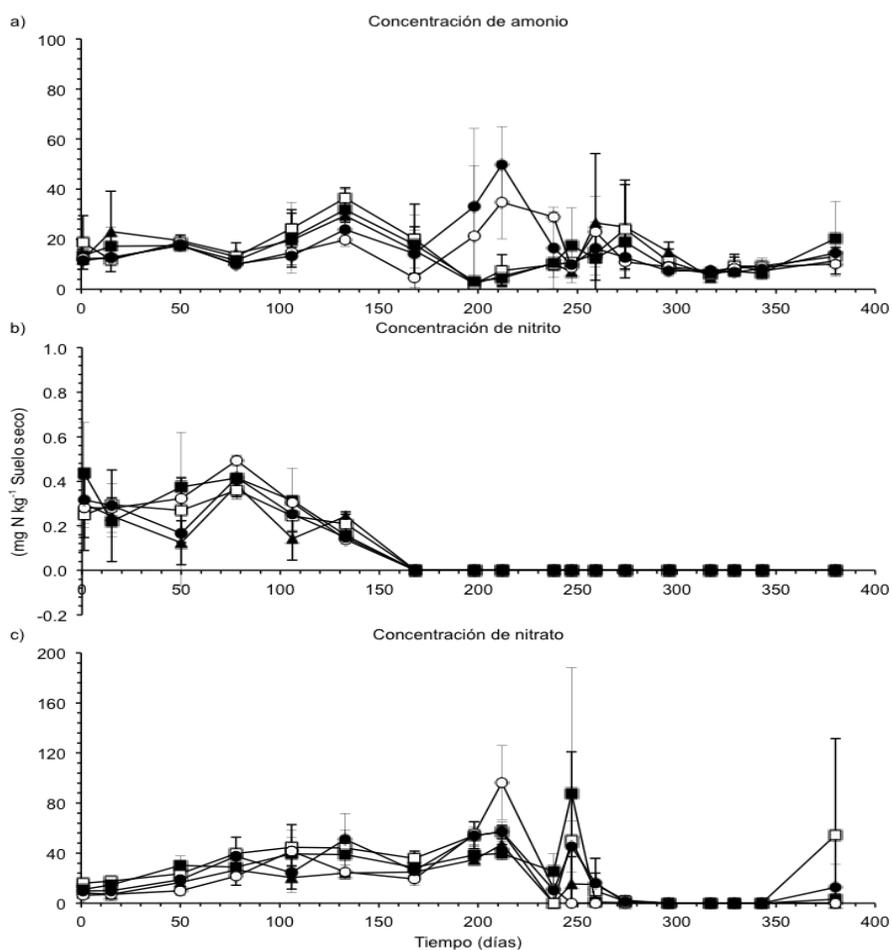


Figura 7. Concentración de nitrógeno inorgánico en el suelo: a) Amonio (g NH₄⁺ -N kg⁻¹), b) nitrito (g NO₂⁻ -N kg⁻¹) y c) nitrato (g NO₃⁻ -N kg⁻¹) en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (△, CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (■, CTRK) labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (□, CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (●, ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (○, ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán.

7.2 Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana a través del tiempo

De las muestras de suelo se obtuvieron un total de 2'078,379 secuencias bacterianas, que representan 33,618 OTUs. Las curvas de rarefacción muestran que aún incluyendo un mayor número de secuencias en el análisis, se obtendría sólo una limitada cantidad de OTUs extra (Fig. 8). Los índices de diversidad Chao1, Shannon y Simpson (81%) fueron significativamente afectados por el tiempo de colecta ($p < 0.001$), mientras que sólo Chao1 por tratamiento ($p < 0.001$) (Fig. 9).

El phylum más abundante fue Proteobacteria ($34.84 \pm 9.99\%$ promedio de todas las colectas y tratamientos), seguido por Actinobacteria ($14.14 \pm 3.64\%$) (Fig. 11). Con algunos grupos bacterianos se observó una variación mayor a lo largo del tiempo, sin embargo, no hubo ningún patrón claro. Por ejemplo, en el tratamiento CTMR, la abundancia relativa de Proteobacteria fue 2.4 veces mayor el 18 de julio de 2017 (63.95%) que el 7 de febrero del mismo año ($26.74 \pm 4.64\%$), mientras que con Actinobacteria se vio un comportamiento opuesto, 10.34% el 18 de julio y $26.31 \pm 3.05\%$ el 7 de febrero.

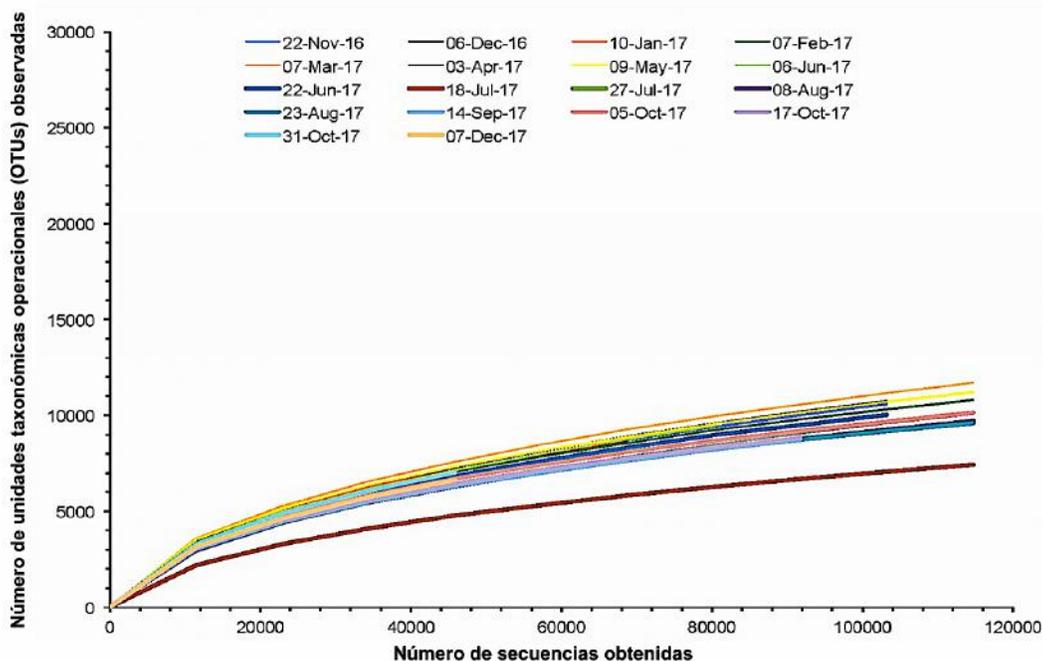


Figura 8. Curvas de rarefacción del número de secuencias versus el número de OTUs en los diferentes días de colecta (n=18).

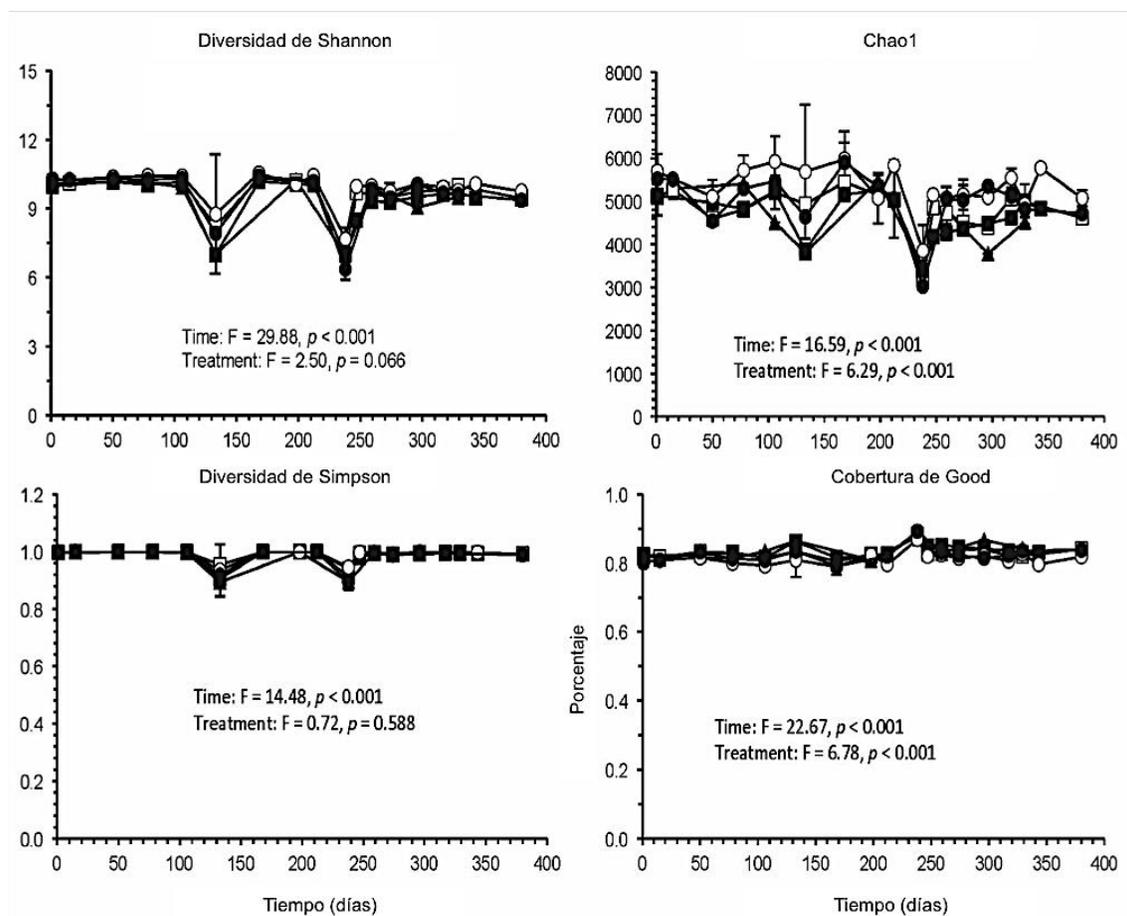


Figura 9. a) Índice de diversidad de Shannon, b) índice de diversidad de Chao1, c) índice de diversidad de Simpson y d) índice de cobertura de Good, para los suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (\triangle , CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (\blacksquare , CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\square , CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (\bullet , ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\circ , ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán.

El genero bacteriano más abundante en el suelo fue *Kaistobacter* ($3.2 \pm 1.5\%$) y su abundancia relativa observada tuvo una distribución uniforme durante el ciclo de cultivo (Fig. 11). *Serratia* ($2.9 \pm 5.82\%$) fue el segundo género más abundante, pero su abundancia relativa tuvo grandes variaciones durante el ciclo, como en el caso de *Bacillus* ($1.88 \pm 6.79\%$) y *Pseudomonas* ($1.64 \pm 5.09\%$). La abundancia relativa de *Serratia* y *Achromobacter* se incrementó hacia el fin del ciclo de cultivo, mientras que la de *Bacillus* tuvo un pico el 3 de abril de 2017 y *Pseudomonas* el 18 y 27 de julio, así como el 8 de agosto del mismo año.

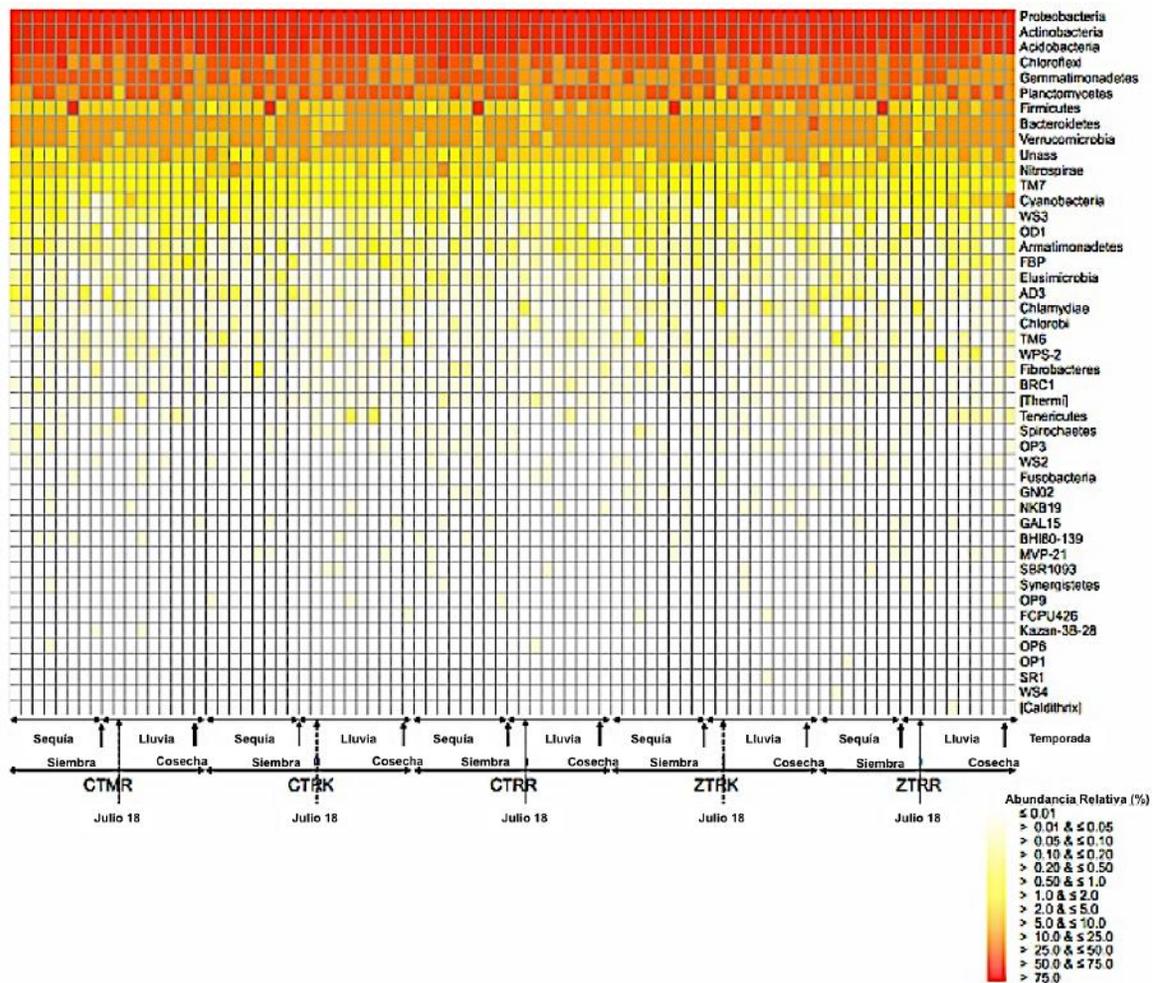


Figura 10. Heatmap con las abundancias relativas de los diferentes phyla bacterianos en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 diciembre de 2017, en El Batán.

Con el análisis perMANOVA se observó un efecto altamente significativo del tiempo de colecta en la estructura de la comunidad bacteriana, considerando los diferentes phyla (F val= 22.54, $p < 0.001$) o incluso más, si se consideran sólo los 50 géneros más abundantes (F val= 30.73, $p < 0.001$) (Tabla 4). Un análisis PCA con todos los phyla bacterianos, los 50 géneros más abundantes, todos los grupos asignados a nivel de género, todos los ordenes bacterianos, los 50 OTUs más abundantes y todas las OTUs, separaron las muestras colectadas el 18 de julio de 2017 del resto de los días de colecta, sin embargo, no hubo un patrón claro debido a las prácticas o a otras fechas de colecta que pudieran distinguirse (Fig. 12).

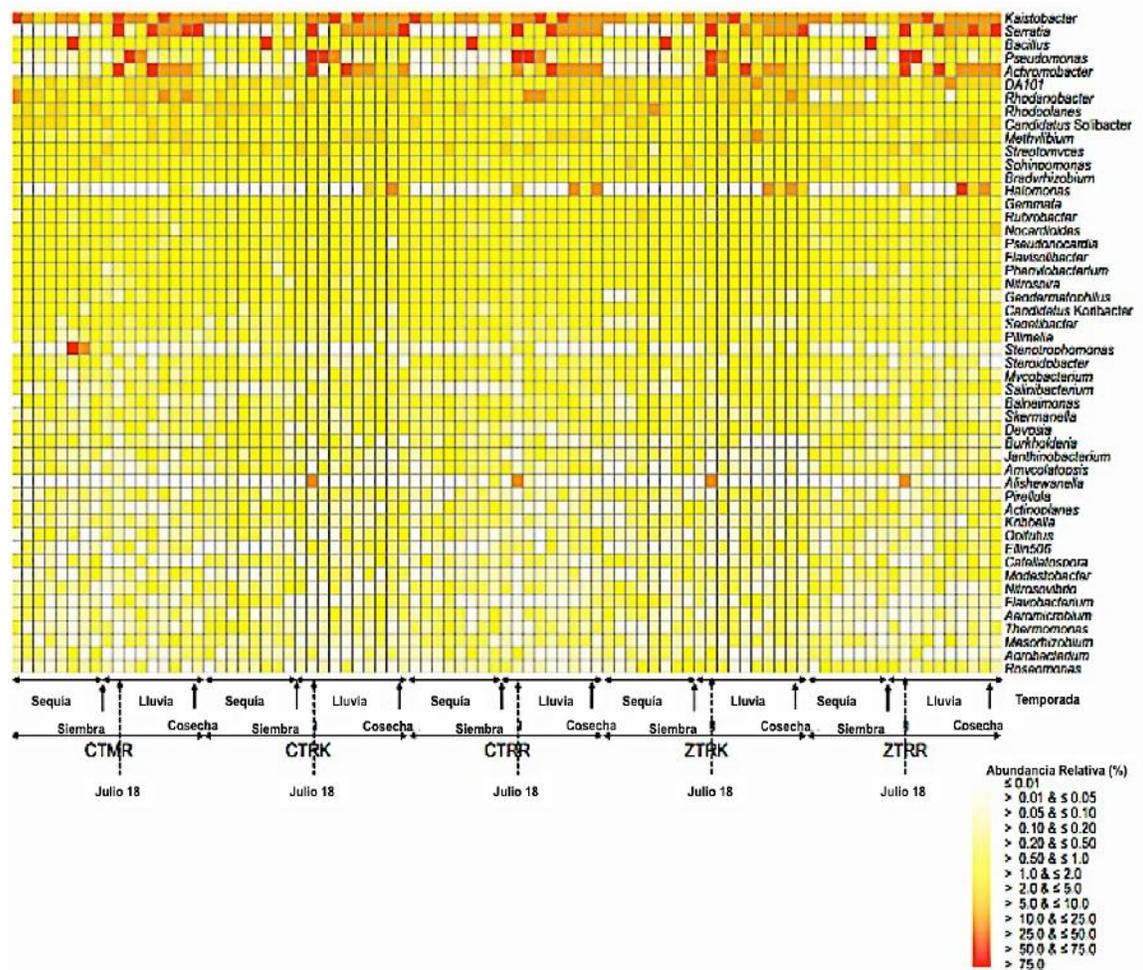


Figura 11. Heatmap con la abundancia relativa de los géneros bacterianos más abundantes, en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán.

La abundancia relativa de *Achromobacter*, *DA101*, Firmicutes, *Methylobium*, Planctomycetes, *Serratia* y Tenericutes disminuyó significativamente con el incremento de la EC, mientras que la de *Agrobacterium* y Gemmatimonadetes aumentó ($p < 0.0001$) (Fig. 13). La abundancia relativa de Bacteroidetes y *Flavobacterium* aumentó significativamente al aumentar el contenido de TOC ($p < 0.0001$). *Amycolaptosis* y *Opitutus* disminuyeron al aumentar el contenido de agua en el suelo, mientras *Achromobacter*, *Kaistobacter*, Proteobacteria y *Pseudomonas* aumentaron ($p < 0.0001$).

La abundancia relativa de un gran número de grupos bacterianos se vio afectada de manera significativa por la concentración de NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- en el suelo.

Tabla 4. Efecto del tiempo, tratamiento y su interacción, labranza, manejo de residuos y su interacción, y rotación de cultivo sobre la estructura de la comunidad bacteriana considerando todos los phyla, todos los grupos asignados a nivel de género y todos los OTUs (Operational Taxonomic Units).

Factor	Phylum		Género		OTU	
	<i>F</i> val.	<i>p</i> val.	<i>F</i> val.	<i>p</i> val.	<i>F</i> val.	<i>p</i> val.
Tiempo	19.57	< 0.001	21.99	<0.001	7.83	< 0.001
Tratamiento	0.65	0.934	2.66	<0.001	4.20	< 0.001
Tiempo Tratamiento	0.42	0.993	0.32	0.945	0.84	0.868
Labranza ^{a, b}	0.76	0.500	3.51	<0.001	5.54	<0.001
Residuos	0.95	0.383	2.53	0.007	4.36	<0.001
Labranza Residuos	0.80	0.530	1.79	0.060	3.04	0.002
Rotación ^b	0.77	0.530	1.08	0.317	2.34	0.008

^a Sólo se consideraron los tratamientos bajo rotación de cultivo, ^b Las colectas fueron incluidas en el análisis como anidadas.

El mejor modelo considerando los phyla bacterianos incluyó el contenido de NO_2^- en todos los tratamientos, excepto el ZTRK, y el contenido de NO_3^- para los 50 géneros más abundantes (Tabla 5). Más del 30% de la variación en la abundancia relativa de Chloroflexi, Cyanobacteria y Gemmatimonadetes pudo ser explicada con el algoritmo random Forest (considerando todas las características del suelo) y >40% de *Methylibium* y *Rhodoplanes* (Fig. 13).

El análisis CAP incluyendo todos los phyla bacterianos y características del suelo, separó claramente el suelo colectado el 18 de julio del resto de las colectas realizadas, pero el modelo no fue significativo ($F= 1.50$ $p= 0.058$) (Fig. 14). El phylum Proteobacteria, principalmente los ordenes Burkholderiales, Pseudomonadales y Xantomadales se vieron favorecidos por la humedad del suelo colectado el 18 de julio (Fig. 10). Algunas de las muestras colectadas al inicio del ciclo de cultivo, en general, se caracterizaron por una gran abundancia relativa de Acidobacteria, Chloroflexi y Gemmatimonadetes; mientras que otras por Actinobacteria (principalmente Actinomycetales) y Firmicutes (principalmente Bacillales). El análisis CAP considerando los 50 géneros más abundantes y las características del suelo como pH,

WC, EC, TOC y Ni, fue altamente significativo ($F= 5.79$, $p= 0.001$) y se observó un efecto claro de los tiempos de colecta (Fig. 15). La separación fue determinada principalmente por la abundancia relativa de seis géneros *Achromobacter*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Kaistobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*, y por las características del suelo. Hubo una mayor abundancia relativa de *Bacillus* y mayor contenido de nitrógeno en las colectas entre el 22 de noviembre de 2016 y 22 de junio de 2017. La abundancia relativa de *Serratia* y *Achromobacter* fue mayor en la comunidad bacteriana del suelo colectado el 18 de julio de 2017 (Fig. 11), además, el contenido de agua y la abundancia relativa de *Kaistobacter* y *Pseudomonas* también fueron mayores que en las muestras colectadas antes del 18 de julio y después del 8 de agosto. También hubo mayor contenido de agua

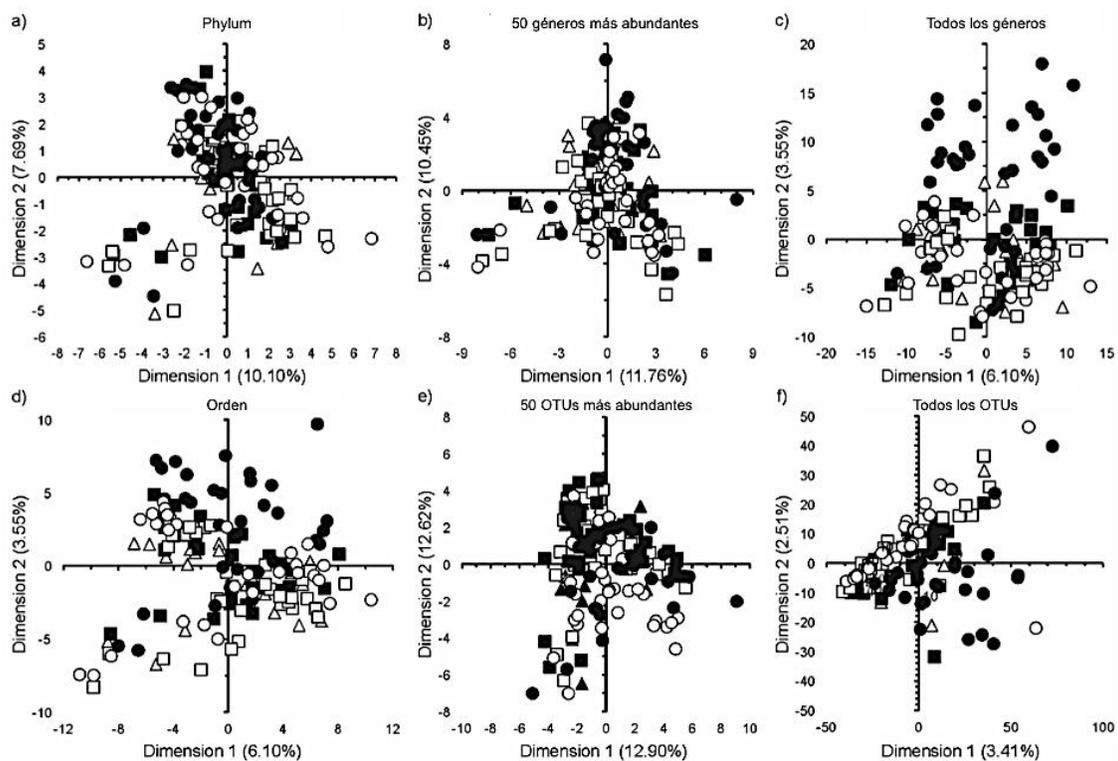


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) para a) la abundancia relativa de los phyla bacterianos, b) los 50 géneros bacterianos más abundantes, c) todos los grupos bacterianos asignados a nivel de género, d) todos los órdenes bacterianos, e) los 50 OTUs bacterianos más abundantes y f) todos los OTUs de los suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (Δ , CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (\blacksquare , CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\square , CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (\bullet , ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\circ , ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán. La imagen se muestra como la arroja el software.

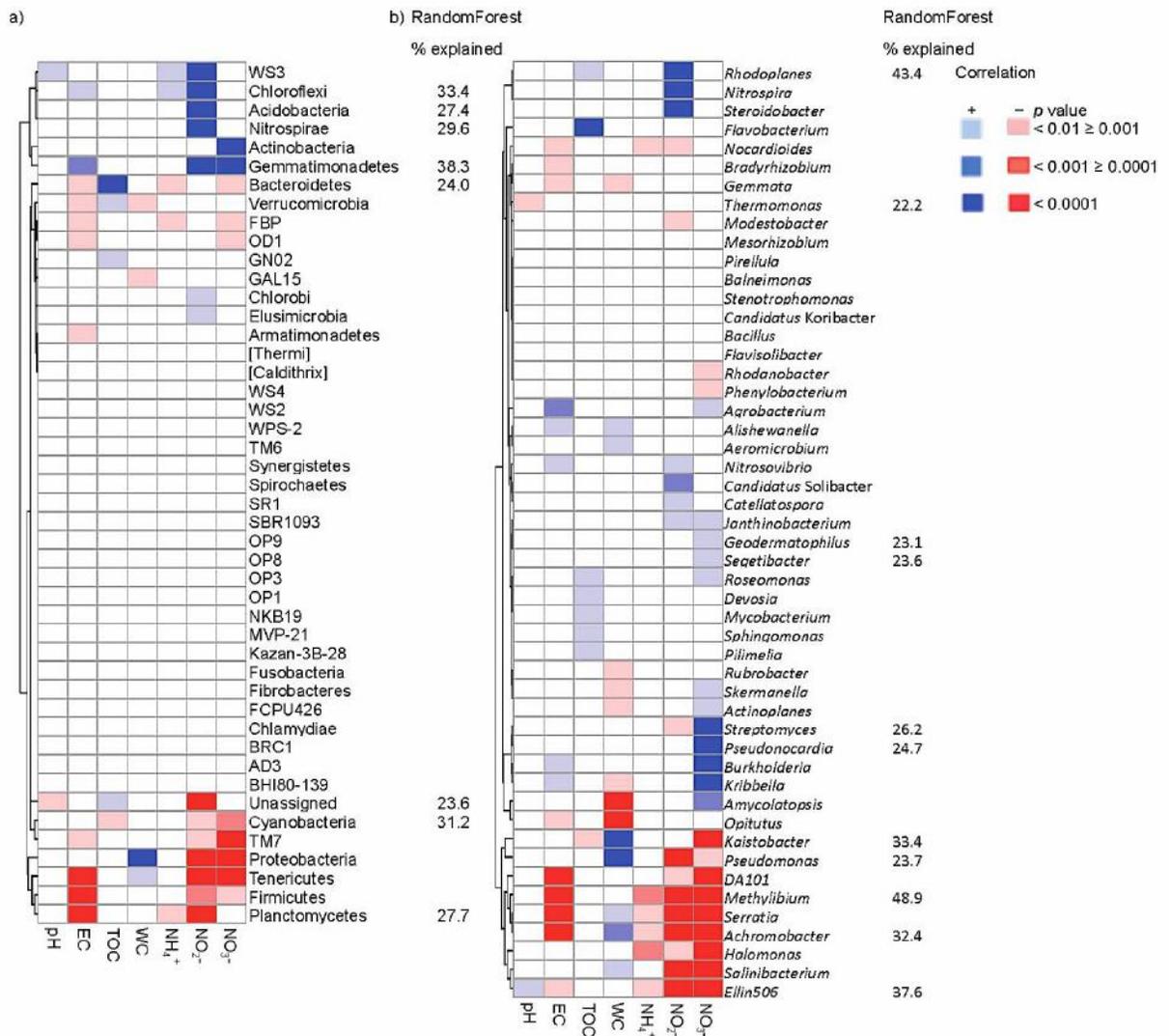


Figura 13. Heatmap de la correlación entre las características del suelo EC, TOC, WC, NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ y la abundancia relativa de a) los phyla bacterianos y b) los 50 géneros más abundantes en los suelos de El Batán. Los dendrogramas fueron construidos con los valores Booleanos utilizando la librería FactoMineR en R. Se utilizó el algoritmo random Forest en R, para buscar un posible efecto de las características del suelo (EC, TOC, WC, NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻) y los tratamientos sobre la abundancia relativa de los diferentes grupos bacterianos.

(WC) en el suelo colectado el 27 de julio y el 8 de agosto y mayor abundancia relativa de *Kaistobacter* y *Pseudomonas*, como el suelo colectado el 18 de julio, pero la abundancia relativa de *Serratia* y *Achromobacter* fue menor. Se observó un bajo contenido de agua y baja abundancia relativa de *Kaistobacter* y *Pseudomonas* en las muestras colectadas después del 8 de agosto y particularmente el 23 de agosto, pero la abundancia relativa de *Serratia* y *Achromobacter* repuntó nuevamente.

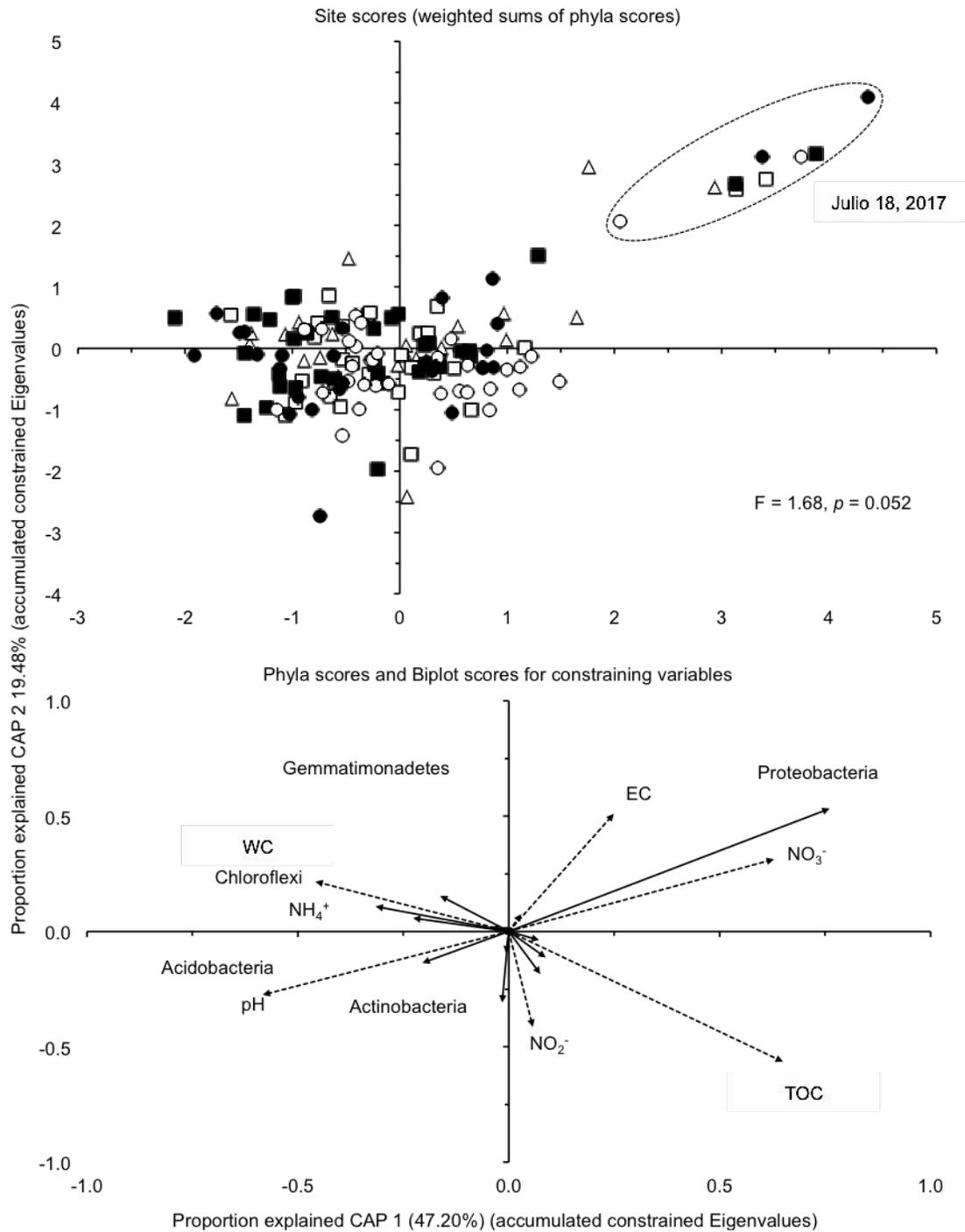


Figura 14. Análisis de componentes canónicos (CAP) de los phyla bacterianos de suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (Δ , CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (\blacksquare , CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\square , CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (\bullet , ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\circ , ZTRR), y las características del suelo, contenido de agua (WC), carbono orgánico total (TOC), pH, conductividad electrolítica (EC), amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-).

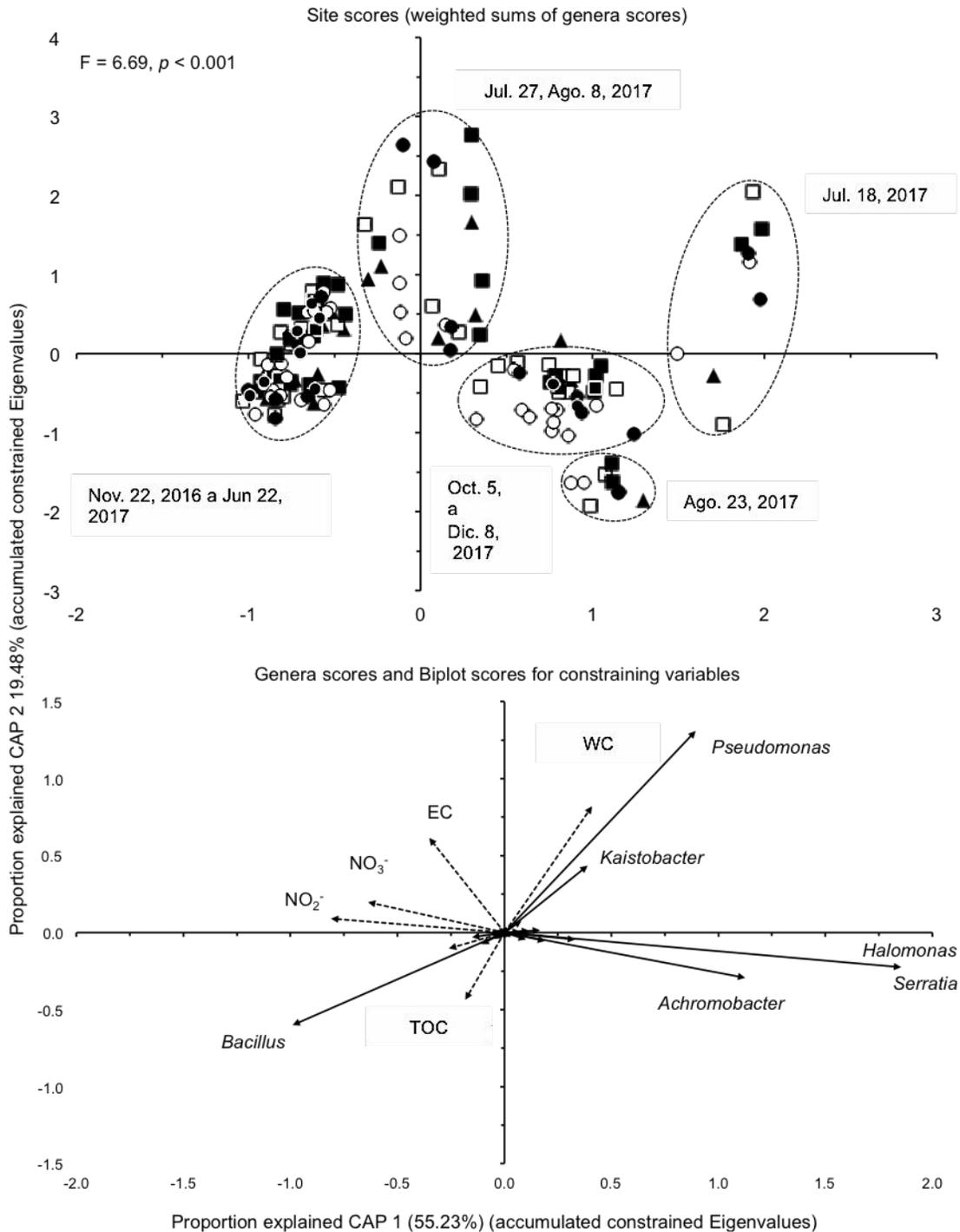


Figura 15. Análisis de componentes canónicos (CAP) de los 50 géneros bacterianos más abundantes en suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (Δ , CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (\blacksquare , CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\square , CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (\bullet , ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\circ , ZTRR), y de las características del suelo, contenido de agua (WC), carbono orgánico total (TOC), pH, conductividad electrolítica (EC), amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-).

7.3 La estructura de la comunidad bacteriana y las prácticas agrícolas

Con el análisis perMANOVA se puso de manifiesto que los tratamientos tuvieron un efecto significativo en la estructura de la comunidad bacteriana, considerando todos los grupos bacterianos asignados a nivel de género (F val= 2.66, $p < 0.001$) y OTUs (F val= 4.20, $p = <0.001$), pero su efecto fue menor al del tiempo de colecta (F val= 21.99, $p = < 0.001$ y F val= 7.83, $p = <0.001$, respectivamente) (Tabla 4). La labranza y el manejo de los residuos vegetales tuvo un efecto altamente significativo en la comunidad bacteriana, considerando todos los grupos asignados a nivel de género y OTUs, pero no así a nivel de phyla ($p \leq 0.007$). La rotación de cultivos tuvo un efecto altamente significativo en la estructura de la comunidad bacteriana a nivel de OTUs ($p = 0.008$).

Con el PCA considerando los phyla, ordenes, los 50 géneros más abundantes, todos los grupos asignados a nivel de género, los 50 OTUs más abundantes y todos los OTUs, no se observó una separación evidente entre los diferentes tratamientos, al parecer, los cambios en los tiempos de colecta enmascararon las diferencias entre los tratamientos (Fig. 12). El análisis CAP no separó los tratamientos en los diferentes días de colecta (dato no mostrado). Además, el CAP no separó los diferentes tratamientos al promediar la abundancia relativa de los phyla bacterianos, ni de los 50 géneros más abundantes y las características del suelo, obteniendo un modelo no significativo (F val= 1.71, $p = 0.177$ para el nivel de phyla y F val= 1.43, $p = 0.234$ para género) (Fig. 16).

Tabla 5. Efecto del tiempo y tratamiento sobre la estructura de la comunidad bacteriana.

Tratamiento ^a	Phylum		Género	
	Correlación	Parámetros	Correlación	Parámetros
Todos	0.215	NO ₃ ⁻ , WC	0.197	NO ₂ ⁻
CTMR	0.275	WC, NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻	0.298	NO ₂ ⁻
CTRR	0.308	NO ₃ ⁻	0.246	NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻
CTRK	0.207	TOC, NO ₃ ⁻	0.265	TOC, NO ₂ ⁻
ZTRR	0.250	NO ₃ ⁻ , WC	0.211	NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , WC
ZTRK	0.206	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻	0.302	NH ₄ ⁺

^a La descripción se encuentra en la Tabla 3

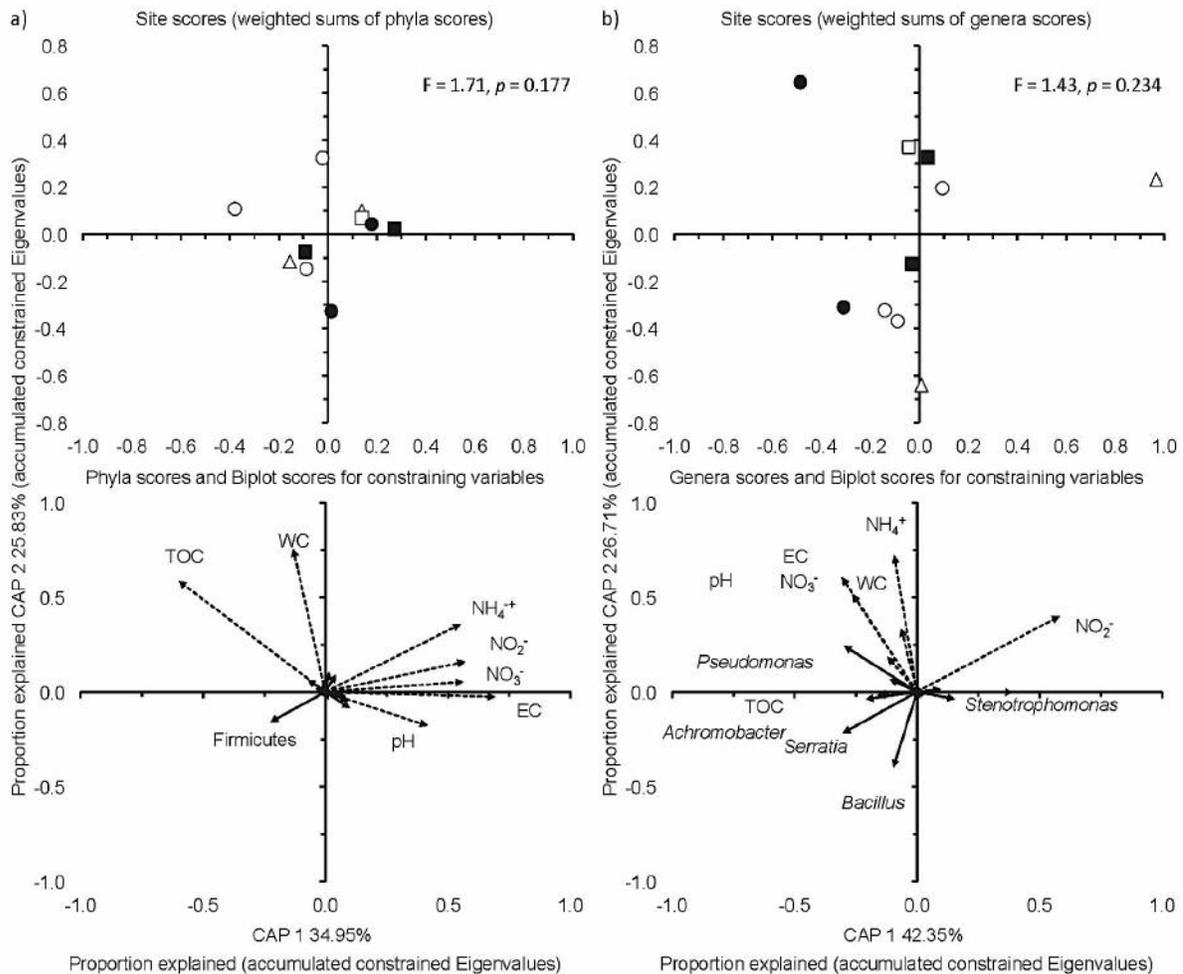


Figura 16. Análisis de componentes canónicos (CAP), de las características del suelo (EC, TOC, WC, NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻) y a) los phyla bacterianos, b) los 50 géneros bacterianos más abundantes de los suelos bajo labranza convencional, monocultivo de maíz y residuos removidos (Δ , CTMR), labranza convencional, rotación maíz-trigo y retención de residuos (\blacksquare , CTRK), labranza convencional, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\square , CTRR), no labranza, rotación maíz-trigo, retención de residuos (\bullet , ZTRK) y no labranza, rotación maíz-trigo y residuos removidos (\circ , ZTRR), colectados 18 veces entre el 22 de noviembre de 2016 y 7 de diciembre de 2017, en El Batán. La gráfica se muestra como la arroja el software.

8. Discusión

8.1 Análisis fisicoquímicos

Las prácticas de manejo de suelos, como la rotación de cultivos, la retención de residuos vegetales y la no labranza, incrementan el carbono orgánico en el suelo (D'Acunto *et al.*, 2018). Como era de esperarse, el contenido de C fue mayor en el tratamiento sin

labranza y con retención de residuos (ZTRK), comparado con el tratamiento bajo labranza convencional y retención de residuos (CTRK), en donde la incorporación de estos residuos y el rompimiento de los agregados del suelo favorece el consumo de fuentes de carbono de fácil asimilación (Schmidt *et al.*, 2011; Upton *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2019). De la misma manera que ocurre con los suelos en los que no se conservan residuos vegetales, en donde también se encuentra una baja concentración de carbono orgánico. La descomposición de la materia orgánica también depende de la calidad de los residuos y las condiciones de humedad, obteniéndose mayor tasa de descomposición cuando se lleva a capacidad de campo (40-60% de WHC) (Benbi y Khosa, 2014), aunque éste es un parámetro que no puede controlarse en parcelas de temporal o a cielo abierto. Durante la temporada de lluvias el tratamiento ZTRK tuvo un mayor contenido de agua comparado con el resto de los tratamientos, lo que puede ser atribuido al contenido de materia orgánica (Moreno *et al.*, 2019), así como a las diferentes etapas de descomposición de ésta conforme aumenta la profundidad del suelo (Valboa *et al.*, 2015). Además, la labranza convencional da un menor rendimiento comparada con los tratamientos sin labranza con retención de cultivo (Verhulst *et al.*, 2011a), que se traduce en un menor aporte de materia orgánica. La deficiencia de SOM en la labranza convencional y monocultivo, comparada con la rotación de cultivos, también puede ser asociada al propio cultivo, ya que se ha encontrado mayor rendimiento en la rotación maíz-trigo, que en el monocultivo de maíz (Govaerts *et al.*, 2005). También se ha demostrado que el trigo, debido a su sistema radicular, aporta mayor cantidad de rastrojo y materia orgánica que el maíz, en los tratamientos donde los residuos vegetales son removidos (Waeber *et al.*, 1926).

La conductividad electrolítica en todos los tratamientos aumentó después de la siembra y fertilización, disminuyendo en los sesenta días posteriores, posiblemente por la demanda de nutrientes del maíz debido a su desarrollo (Eyhereaguibel y Morard, 2008). El rompimiento de los agregados del suelo no sólo libera C y N, sino que, al igual que la degradación los residuos vegetales, libera una importante cantidad de minerales que pueden aumentar la EC (Abdollahi y Munkholm, 2014; Shahbaz *et al.*, 2017). Lo anterior podría explicar el por qué de la mayor EC en el tratamiento CTRK comparado con los tratamientos CTMR y ZTRK. Las concentraciones de nitrato y amonio disminuyeron durante los sesenta a setenta días posteriores a la aplicación del

fertilizante, probablemente debido a el consumo de nitrógeno por parte de la planta y también al proceso de desnitrificación (Eyhereaguibel y Morard, 2008; Ward y Jensen, 2014).

La acidificación del pH del suelo se atribuye principalmente a la acumulación de compuestos húmicos, aunque sólo comprenden una pequeña fracción de la materia orgánica del mismo (Schmidt *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2018); en todo caso, los cambios en el contenido de agua, la conductividad electrolítica, el carbono y el nitrógeno influyen en los cambios en la composición estructural de las comunidades bacterianas de nuestro modelo de estudio y no el pH, lo que contrasta con los reportes de Kaiser *et al.* (2016); Liu *et al.* (2017) y Legrand *et al.* (2018).

8.2 Phyla dominantes

La abundancia relativa de los phyla bacterianos presentes en el suelo pueden ser afectados por una gran variedad de factores bióticos y abióticos (Fierer, 2017; Xue *et al.*, 2018). En suelos agrícolas la labranza, el manejo de residuos vegetales, la rotación de cultivos y el uso de fertilizantes puede ocasionar cambios en la estructura de las poblaciones bacterianas (Babin *et al.*, 2019). En este caso en particular no se observaron cambios significativos derivados de las prácticas agrícolas durante el ciclo de cultivo. Muchos estudios han puesto en evidencia la influencia del maíz en las poblaciones bacterianas, sus exudados radicales pueden ejercer tanto influencia positiva como negativa (Ludueña *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2018; Ely y Smets, 2019). Los tres phyla más abundantes en las parcelas experimentales, Proteobacteria, Actinobacteria, y Acidobacteria, han sido descritas como phyla dominantes en una amplia variedad de cultivos, ambientes y ecosistemas (Caldwell *et al.*, 2015; Bonanomi *et al.*, 2016) ya que su abundancia tiende a estar fuertemente asociada a su estrategia trófica (Bastida *et al.*, 2017). El phylum Proteobacteria se ha reportado como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), asociado a una amplia variedad de hospederos (Trivedi *et al.*, 2016), mientras que Acidobacteria ha sido reportado como oligótrofos con poblaciones altamente sensibles al pH del suelo (Hartmann *et al.*, 2015), aunque no se encontró dicha correlación en este estudio. Los miembros del phylum Actinobacteria son resistentes a la desecación y tienen la capacidad de degradar materia orgánica

recalcitrante, así como de producir una amplia diversidad de enzimas extracelulares y metabolitos (Moreno *et al.*, 2019); así como los Bacteroidetes que se han correlacionado positivamente con el carbono orgánico total, además de considerarse importantes PGPB (Babin *et al.*, 2019). Choloroflexi y Cyanobacteria se han descrito como sensibles a cambios en la estructura del suelo, la deficiencia de N y del contenido de agua en el suelo; Chloroflexi se ve favorecido, mientras que Cyanobacteria se ve afectado de forma negativa (Trivedi *et al.*, 2016), lo que concuerda con los resultados observados. De la misma manera, se encontró una tendencia opuesta en la abundancia relativa de Gemmatimonadetes, usualmente reportados como oligótrofos, con una amplia distribución en ecosistemas terrestres y que han demostrado adaptarse a la desecación (DeBruyn *et al.*, 2011) y Actinobacteria, de acuerdo con los reportes previos.

Los phyla dominantes dan estabilidad a la comunidad bacteriana del suelo, mientras que aquellos con baja abundancia aseguran la resistencia y resiliencia a los cambios ambientales (Jiao *et al.* 2019).

8.3 Cambios en las poblaciones de los diferentes tratamientos

Como ya se había mencionado antes, las parcelas experimentales incluyen tres tratamientos convencionales y dos de conservación, con diferencias en la labranza y la retención de residuos vegetales, por lo que se esperaría un efecto significativo de los tratamientos sobre las comunidades bacterianas. Por una parte, la ruptura de los agregados del suelo debida a la labranza podría impactar a las comunidades bacterianas al dejar expuestas fuentes de carbono de fácil asimilación, estimulando positivamente a los organismos copiótrofos (Carbonetto *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2018). Aún cuando estudios como los realizados por Wang *et al.* (2019) demuestran que la tasa de descomposición del C orgánico del suelo es mayor durante la época de sequía, sólo una pequeña fracción de las comunidades bacterianas del suelo son resistentes a la sequía (Preece *et al.*, 2019); lo que concuerda con los resultados observados. Entonces, la adición de materia orgánica al suelo puede moldear la estructura de las comunidades bacterianas, a la vez que las protege de la desecación (Bastida *et al.*, 2017).

Por otro lado, D'Acunto *et al.* (2018) han reportado que la rotación de cultivos incrementa la diversidad bacteriana de los suelos entre un 3.5 a 4.0%. Sin embargo, dos de cada tres estudios de una gran variedad de cultivos no muestran diferencia en la diversidad microbiana entre monocultivos y cultivos en rotación. Una mayor variedad de cultivos en rotación rinde una mayor diversidad microbiana, con mayor biomasa y actividad metabólica, favoreciendo la formación de agregados en el suelo (D'Acunto *et al.*, 2018). También las raíces tienen influencia sobre los agregados del suelo, facilitando la formación de una variedad de nichos y microagregados que contienen una mayor diversidad que los macroagregados. Esta dinámica brinda resiliencia a los suelos contra los cambios ambientales (Upton *et al.*, 2019).

El efecto significativo de los tratamientos y la baja interacción con el efecto de la temporada de muestreo-tratamiento, indican que las prácticas de manejo intensivo, con el tiempo, pueden ocasionar una gran similitud en la diversidad biológica y funcional (Hamm *et al.*, 2016; Legrand *et al.*, 2018).

Un estudio previo de Navarro-Noya *et al.* (2013) encontró un efecto significativo del efecto del manejo de residuos vegetales y la labranza sobre la estructura de la comunidad bacteriana, pero no así de la rotación de cultivos. En este estudio se confirma el efecto del manejo de los residuos vegetales y la labranza y el efecto de la rotación de cultivos, maíz versus maíz-trigo, considerando todos los OTUs. Y este efecto puede estar asociado a la rizósfera y/o a la diferencia en la composición de los residuos vegetales (Haichar *et al.*, 2008; Maarastawi *et al.*, 2018).

8.4 Cambios en las poblaciones a través del tiempo

Durante la temporada de sequía (día 1 a 198) el bajo WC, la alta concentración de N inorgánico y TOC del suelo, favorecieron a las Actinobacterias, que son consideradas colonizadores secundarios del suelo y a los Firmicutes, resistentes a la desecación y formadores de esporas (Triphati *et al.*, 2017), particularmente al genero *Bacillus*, coincidiendo con los reportes de Delgado-Baquerizo *et al.* (2017). Actinobacteria es un phylum funcionalmente diverso, conocido como degradador de materia orgánica y con una respuesta positiva a altas concentraciones de N (Hamm *et al.*, 2016); sin embargo,

la correlación positiva con el NO_3^- y no con el NH_4^+ contrasta con los resultados de Hamm *et al.* (2016). El género *Bacillus* es un importante miembro de la comunidad bacteriana del suelo, con un rol activo en los ciclos biogeoquímicos del C, N y P. Además, son capaces de solubilizar K, Zn y Fe (Meena *et al.*, 2016); algunos integrantes de este género pueden desarrollarse con baja disponibilidad de nutrientes, y pueden fungir como control biológico contra patógenos del suelo (McSpadden Gardener, 2004). El tres de abril las concentraciones de NO_3^- , NO_2^- , EC y WC se encontraron entre sus más bajas concentraciones, coincidiendo con los valores de abundancia relativa más altos de *Bacillus*. El phylum Proteobacteria, es comúnmente reportado como copiótrofo, por lo que era de esperarse una tendencia a la baja, comparado con Firmicutes y Actinobacterias durante el periodo de sequía, tal como pudo observarse (Tripathi *et al.*, 2017).

El 18 de julio ocurrió un importante incremento en WC y una ligera baja en la EC, TOC y concentración de NO_3^- , lo que favoreció a la abundancia relativa de los géneros *Kaistobacter* y *Pseudomonas*. Se ha reportado que el contenido de agua en el suelo ejerce un efecto positivo en dichos géneros, aún más que otros parámetros fisicoquímicos (Moreno-Espíndola *et al.*, 2018), y esto concuerda con la correlación positiva observada entre el contenido de agua del suelo con los géneros *Kaistobacter* y *Pseudomonas*, y la correlación negativa del N inorgánico y el TOC con *Kaistobacter*, género que también ha sido reportado como antagonista a patógenos del suelo (Jiao *et al.*, 2019), mientras que algunas especies de *Pseudomonas* han sido reportadas como PGPB (Martínez *et al.*, 2018). La siembra de maíz ocurrió en el día 183 (mayo 24) y su etapa de desarrollo dura entre 70 y 100 días, por lo que la disminución de NO_3^- y el comportamiento de *Kaistobacter* y *Pseudomonas* pueden estar relacionadas con el desarrollo del cultivo (Tao *et al.*, 2018). La hidrólisis de la urea que se aplica como fertilizante libera NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- , la oxidación del NH_4^+ ocurre casi al instante por acción de los nitrificantes y contribuye poco al resto de la comunidad bacteriana, por lo que podemos asumir que la alta correlación de la comunidad bacteriana con el N_i , no es con el N *per se*, sino con los procesos como la mineralización de la materia orgánica o liberación del N inmovilizado. La relación C:N en la materia orgánica de fácil asimilación moldeará a la comunidad bacteriana y su actividad determinará la liberación del N al ambiente (Masunga *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017).

El contenido de agua en el suelo y la EC aumentaron entre los días 198 y 317 (junio 22 a octubre 5), mientras que se observó una tendencia opuesta del NO_3^- y los valores de NO_2^- se mantuvieron cercanos a cero, esto coincide con los resultados de Bastida *et al.* (2017), quienes reportaron que el N inorgánico tiende a acumularse durante la temporada de sequía.

El género *Halomonas* se ha reportado como descomponedor de materia orgánica en suelos agrícolas con una alta tasa de C:N (De la Cruz-Barrón *et al.*, 2017), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde presenta una baja correlación con la concentración de N y TOC. Mientras que *Serratia* se ha descrito como un género capaz de producir auxinas y fijar N en vida libre, por actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (Martínez *et al.*, 2018), además, se ha descrito como un importante solubilizador de fosfatos, con un gran potencial como PGPB, capaz de establecer interacciones positivas con el maíz (Ludueña *et al.*, 2018). *Serratia* se encontró correlacionado de manera positiva con el WC y de manera negativa con el N_i y la EC, tal vez debido a su capacidad para fijar N. El género *Achromobacter* se ha descrito como un PGPB capaz de producir sideróforos, y tolerante a una variedad de metales pesados (Sayyed *et al.*, 2019). Hubo una correlación positiva de *Achromobacter* a la WC y negativa a la CE y el N, y su alta abundancia relativa al final de la temporada de crecimiento podría estar asociada a la presencia del cultivo y sus exudados radicales (Ely y Smets, 2019).

Varios estudios han analizado los cambios en las comunidades microbianas durante largos periodos de tiempo entre las tomas de muestra, por ejemplo medio año, un año o aún más tiempo (Orr *et al.*, 2015), sin encontrar cambios atribuibles al tiempo, pero sí atribuibles al manejo del suelo (Hartmann *et al.*, 2015). Por lo que es importante seleccionar un intervalo adecuado de tiempo entre los muestreos para optimizar la evaluación de estos cambios. Actualmente, los estudios de la respuesta microbiana a los cambios en la temperatura pueden subestimar la importancia de la humedad del suelo, mientras que se ha demostrado que la humedad del suelo puede ocasionar cambios en las comunidades microbianas de suelos tropicales y subtropicales (Wang *et al.*, 2019). La precipitación anual promedio y directamente el contenido de agua del suelo, puede

ejercer una importante influencia sobre las comunidades microbianas, como lo reportaron Trivedi *et al.* (2016) y Tripathi *et al.* (2017), que también encontraron que la estructura y función del microbioma del suelo son fuertemente influidos por las condiciones climáticas; y que los cambios en la composición de la comunidad están asociados a cambios en su funcionalidad (Moreno *et al.*, 2019). Las bajas abundancias relativas de algunas bacterias pueden permanecer así entre las estaciones, con florecimientos ocasionales en respuesta a cambios ambientales súbitos (Shade *et al.*, 2014; Orr *et al.*, 2015; Jiao *et al.*, 2019).

9. Conclusiones

- ❖ El contenido de agua del suelo tuvo grandes variaciones como resultado de la fluctuación de las precipitaciones a lo largo del año.
- ❖ El nitrógeno inorgánico, principalmente el nitrato producto de la mineralización de la materia orgánica y la aplicación de fertilizante, tuvo grandes cambios durante el ciclo de cultivo, ya que la actividad bacteriana varía en función del contenido de agua y la disponibilidad de materia orgánica de fácil asimilación.
- ❖ La estructura de la comunidad bacteriana tuvo variaciones significativas correlacionadas a la fluctuación del agua y el contenido de N_i del suelo durante el ciclo de cultivo.
- ❖ El análisis CAP de los 50 géneros bacterianos más abundantes y las características fisicoquímicas del suelo, agrupó dichas variaciones considerando seis géneros principales: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Kaistobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*, y el contenido de agua, carbono orgánico, nitrito, nitrato y la conductividad electrolítica.

10. Referencias

1. Abdollahi, L., Munkholm, L.J., 2014. Tillage system and cover crop effects on soil quality: I. chemical, mechanical and biological properties. *Soil Water Manag. Conserv.* 78, 262-270. <https://doi.org/10.2136/sssaj2013.07.0301>.
2. Ancinas, S.G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D.E., Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D.L., Polz, M.F., 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430, 551–553.
3. Alvarado, A., 2006. Potential of soil carbon sequestration in Costa Rica. En: Lal R., Cerni C.C., Bernoux M., Etchevers J., Ceri C.E. P. Ed. *Carbon Sequestration in Soil of Latin America*. The Harworth Press Inc., USA, pp. 554.
4. Amato, M., 1983. Determination of carbon ^{12}C and ^{14}C in plant and soil. *Soil Biol. Biochem.* 15, 611–612.
5. Arrouays D., McKenzie N., Hempel J., de Forges A.R., McBratney A.B., 2014. *GlobalSoilMap: Basis of the global spatial soil information system*. Ed. Taylor and Francis. Canberra, Australia. pp. 494.
6. Ashworth, A.J., DeBruyn, J.M., Allen, F.L., Radosevich, M., Owens, P.R., 2017. Microbial community structure is affected by cropping sequences and poultry litter under long-term no-tillage. *Soil Biol. Biochem.* 114, 210-219. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.201707019>.
7. Babin, D., DEubel, A., Jacquiod, S., Sorensen, S.J., Geistingler, J., Grosch, R., Smalla, K., 2019. Impact of long-term agricultural management practices on soil prokaryotic communities. *Soil Biol. Biochem.* 129, 17-28. <https://doi.org/10.16/j.soilbio.2018.11.002>.
8. Balter M., 2007. Seeking Agriculture's Ancient Roots. *Science*, 316, 1830–1835.
9. Banning, N.C., Gleeson, D.B., Grigg, A.H., Grant, C.D., Andersen, G.L., Brodie, E.L., Murphy, D.V., 2011. Soil microbial community successional patterns during forest ecosystem restoration. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(17), 6158-6164. <https://doi.org/10.1128/AEM.00764-11>.
10. Bastida, F., Torres, I.F., Hernández, T., García, C., 2017. The impact of organic amendments: Do they confer stability against drought on the soil microbial

- community? *Soil Biol. Biochem.* 113, 173-183.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.012>.
11. Bernard, E., Larkin, P.R., Tavantzis, S., Erich, S.M., Alyokhin, A., Sewell, G., Lannan, A., Gross, D.S., 2012. Compost, rapeseed rotation, and biocontrol agents significantly impact soil microbial communities in organic and conventional potato production systems. *Appl. Soil Ecol.* 52, 29–41.
 12. Beuchelt D.T., Camacho-Villa C.T., Göring L., Hernández-Rodríguez V.M., Hellin J., Sonder K., Erenstein O., 2015. Social and income trade-offs of conservation agriculture practices on crop residue use in Mexico's central highlands. *Agric. Syst.* 134, 61–75.
 13. Bimüller, C., Kreyling, O., Kölbl, A., von Lützwow, M., Kögel-Knabner, I., 2016. Carbon and nitrogen mineralization in hierarchically structured aggregates of different size. *Soil Till. Res.* 160, 23–33.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2015.12.011>.
 14. Bonanomi, G., De Filippis, F., Cesarano, G., La Stora, A., Ercolini, D., Scala, F., 2016. Organic Farming induces changes in soil microbiota that affect agroecosystem functions. *Soil Biol. Biochem.* 103, 327-336.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.09.005>.
 15. Breiman, L., Cutler, A., (Fortran original) Liaw, A., Wiener, M., (R port), 2015. Breiman and Cutler's Random forests for classification and regression. Classification and regression based on a forest of tree using random inputs. Package: randomForest Version: 4.6-12.
<https://CRAN.Rproject.org/package=randomForest>
 16. Brevik E.C., Calzolari C., Miller B.A., Pereira P., Kabala C., Baumgarten A., Jordán A., 2016. Soil mapping, classification, and pedologic modeling: history and future directions. *Geoderma*, 264, 256–274.
 17. Bull, I.D., Betancourt, P.P., Evershed, R.P., 2001. An organic geochemical investigation of the practice of manuring at a Minoan Site on Pseira Island, Crete. *Geoarchaeology*. 16, 223–242.
 18. Caldwell, A.C., Silva, L.C.F., da Silva, C.C., Ouvemey, C.C., 2015. Prokaryotic diversity in the rhizosphere of organic, intensive, and transitional coffee farms in Brazil. *PLoS ONE* 10(6), e0106355.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106355>.

19. Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R., 2010a. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266-267. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp636>.
20. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, 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., 2010b. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nature Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.
21. Carbonetto, B., Rascovan, N., Álvarez, R., Mentaberry, A., Vázquez, 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(6), e99949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099949>.
22. Cassel, D.K., Nielsen, D.R., 1986. Field capacity and available water capacity. In: Klute, A. (Ed.), *Methods of soil analysis, Part 1. Physical and mineralogical methods* (2nd Edition). American society of agronomy, Agronomy monographs 9. Madison, Wisconsin.
23. Ceja-Navarro, J.A., Rivera-Orduña, F.N., Patiño-Zúñiga, L., Vila-Sanjurjo, A., Crossa, J., Govaerts, B., Dendooven, L., 2010. Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (11), 3685–3691. <https://doi.org/10.1128/AEM.02726-09>.
24. Chao, A., 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* 11, 265-270. <https://www.jstor.org/stable/4615964>.
25. Chaudhry, V., Rehman, A., Mishra, A., Chauhan, P.S., Nautiyal, C.S., 2012. Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microb. Ecol.* 64(2), 450-460. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0025-y>

26. Christensen, B., 2001. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *Eur. J. of Soil Sc.* 52, 345-353. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2001.00417.x>
27. D'Acunto, L., Andrade, J.F., Poggio, S.L., Semmartin, M., 2018. Diversifying crop rotation increased metabolic soil diversity and activity of the microbial community. *Agricul. Ecosyst. Environ.* 257, 159-164. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.02.011>.
28. Datta A., Smith P., Lal R., 2013. Effects of long-term tillage and drainage treatments on greenhouse gas fluxes from a cornfield during the fallow period. *Agric. Ecosyst. and Environ.* 171, 112–123.
29. De la Cruz-Barrón, M., Cruz-Mendoza, A., Navarro-Noya, Y.E., Ruiz-Valdiviezo, V.M., Ortiz-Gutiérrez, D., Ramírez-Villanueva, D.A., Luna-Guido, M., Thierfelder, C., Wall, P.C., Verhulst, N., Govaerts, B., Dendooven, L., 2017. The bacterial community structure and dynamics of carbon and nitrogen when maize (*Zea mays* L.) and its neutral detergent fiber were added to soil from Zimbabwe with contrasting managements practices. *Microb. Ecol.* 73, 135-152. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0807-8>.
30. De Rosa, D., Rowling, D.W., Biala, J., Scheer, C., Basso, B., McGree, J., Grace, P.R., 2016. Effect of organic and mineral N fertilizers on N₂O emissions from an intensive vegetable rotation. *Biol. Fert. Soils*, 52, 895–908. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1117-5>.
31. DeBruyn, J.M., Nixon, L.T., Fawaz, M.N., Johnson, A.M., Radosevich, M., 2011. Global biogeography and quantitative seasonal Dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (17), 6295-6300. <https://doi.org/10.1128/AEM.05005-11>.
32. Delgado-Baquerizo, M., Reich, P.B., Khachane, A.N., Campbell, C.D., Thomas, N., Freitag, T.E., Al-Soud, W.A., Sorensen, S., Bardgett, R.D., Singh, B.K., 2017. It is elemental: soil nutrient stoichiometry drives bacterial diversity. *Environ. Microbiol.* 19(3), 1176-1188. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13642>.
33. Dendooven, L., Patiño-Zúñiga, L., Verhulst, N., Luna-Guido, M., Marsch, R., Govaerts, B., 2012. Global warming potential of agricultural systems with

- contrasting tillage and residue management in the central highlands of Mexico. *Agric. Ecosyst. Environ.* 152, 50-58. <https://doi.org/j.agee.2012.02.010>.
34. Dini-Andreote, F., Stegen, J.C., van Elsas, J.D., Falcão Salles, J., 2015. Disentangling mechanisms that mediate the balance between stochastic and deterministic processes in microbial succession. *PNAS*, E1326-E1332. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1414261112.
 35. Drury, C., Reynolds W., Tan, C., Welacky, T., Calder, W., McLaughlin, N., 2006. Emissions of nitrous oxide and carbon dioxide: influence of tillage type and nitrogen placement depth. *Soil Sc. Soc. Am. J.* 70, 570-581. <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0042>.
 36. Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460-2461.
 37. Ely, C.S., Smets, B.F., 2019. Guild composition of root-associated bacteria changes with increased soil contamination. *Microb. Ecol.* 78, 416-427. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01326-6>.
 38. Escalante, A.E., 2008. Ecología molecular en el estudio de las comunidades bacterianas. En: Aguirre, X., Souza, V., Eguiarte, L.E., (Eds.), *Ecología molecular*, Conabio, INE. Ciudad de México, Pp. 393-424.
 39. Eyheraguibel, B., Morard, J.P.S., 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresour. Technol.* 99, 4206-4212. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.082>.
 40. Federer, W.T. 1977. *Experimental designs: Theory and applications*, Oxford and IBH Publishing Co.
 41. Federer, W.T., Crossa, J., 2012. Screening experimental designs for quantitative trait loci, association mapping, genotype by environment interaction, and other investigations. *Front Physiol.* 3, 156. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00156>.
 42. Fernandez, A.L., Sheaffer, C.C., Wyse, D.L., Staley, C., Gould, T.J., Sadowsky, M.J., 2016. Associations between soil bacterial community structure and nutrient cycling functions in long-term organic farm soils following cover crop and organic fertilizer amendment. *Sci. Total Environ.* 566-567, 949-959. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.073>.

43. Fierer, N., 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>.
44. Figuerola, E.L.M., Guerrero, L.D., Türkowsky, D., Wall, L.G., Erijman, L., 2015. Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at regional scale. *Environ. Microbiol.* 17, 678–688. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12497>.
45. Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.P., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C.I., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, I.C., Ramankutty, N., Snyder, P.K., 2005. Global consequences of land use. *Science*, 309, 570–574.
46. Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 243–270.
47. Gee, G.W., Bauder, J.W., 1986. Particle-size analysis. En: Klute, A. (Ed.), *Methods of soil analysis, Part 1. Physical and mineralogical methods* (2nd Edition). American society of agronomy, Agronomy monographs 9. Madison, Wisconsin.
48. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910275107>
49. Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leiro, M. y Seoane, S., 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37, 877–887.
50. Gilbert, J.A., Field, D., Swift, P., Newbold, L., Oliver, A., Smyth, T., Somerfield, P.J., Huse, S., Joint, I., 2009. The seasonal structure of microbial communities in the western English channel. *Environ. Microbiol.* 11(12), 3132–3139. <https://10.1111/j.1462-2920.2009.02017.x>.
51. Good, I.J., 1953. The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika*, 40, 237–264. <https://doi.org/10.1093/biomet/40.3-4.237>

52. Goss-Souza, D., Mendes L.W., Borges, C.D., Baretta, D., Tsai, M.S., Rodrigues, L.M., 2017. Soil microbial community dynamics and assembly under long-term land usage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93(10). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix09>.
53. Govaerts, B., Mezzalama, M., Sayre, K.D., Crossa, J., Lichter, K., Troch, V., Vanherck, K., De Corte, P., Deckers, J., 2008. Long-term consequences of tillage, residue management, and crop rotation on selected soil micro-flora groups in the subtropical highlands. *Appl. Soil Ecol.* 38, 197–210.
54. Govaerts, B., Sayre, K.D., Goudeseune, B., De Corte, P., Lichter, K., Dendooven, L., Deckers, J., 2009. Conservation agriculture as a sustainable option for the central Mexican highlands. *Soil Tillage Res.* 103, 222-230.
55. Haichar, F.Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W., 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J.* 2, 1221-1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>.
56. 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. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.08.009>.
57. Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mäder, P., Widmer, F., 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *ISME J.* 9, 1177-1194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.210>.
58. Herlemann, D.P.R., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Anderson, A.F., 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 Km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571-1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>.
59. Hobara, S., Osono, T., Hirose, D., Noro, K., Hirota, M., Benner, R., 2014. The roles of microorganisms in litter decomposition and soil formation. *Biogeochem.* 118, 471-486. <https://doi.org/10.1007/s10533-013-9912-7>.
60. Hoffman, 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.
61. Homburg J.A., Sandor J.A., 2011. Anthropogenic effects on soil quality of ancient agricultural systems of the American Southwest. *Catena*, 85, 144–154.

62. Hontoria, C., Gómez-Paccard, C., Mariscal-Sancho, I., Benito, M., Pérez, J., Espejo, R., 2016. Aggregate size distribution and associated organic C and N under different tillage systems and Ca-amendment in a degraded Ultisol. *Soil Till. Res.* 160, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.01.003>.
63. Huang, X. F., Chaparro, J., Reardon, K., Zhang, R., Shen, Q. y Vivanco, J., 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 9, 267–275.
64. IUSS Working Group WRB., 2006. World Reference Base for Soil Resources 2006, International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports, No. 106. FAO, Rome.
65. Jiao, S., Wang, J., Wei, G., Chen, W., Lu, Y., 2019. Dominant role of abundant rather than rare bacterial taxa in maintaining agro-soil microbiomes under environmental disturbances. *Chemosphere* 235, 248-259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.174>.
66. Kaiser, K., Wemheuer, B., Korolkow, V., Wemheuer, F., Nacke, H., Schöning, I., Schrupf, M., Daniel, R., 2016. Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forest. *Sci. Reports* 6, 33696. <https://doi.org/10.1038/srep33696>.
67. Kim, Y., Liesack, W., 2015. Differential assemblage of functional units in paddy soil microbiomes. *PLoS ONE*. 10(4), E0122221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122221>.
68. Kolde, K.R. Maintainer Raivo, Package ‘pheatmap’, (Version: 1.0.8.), Date: 2015-07-02. <https://CRAN.Rproject.org/package=pheatmap>
69. Lal R., 1997. Degradation and resilience of soils. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, 352, 997–1010.
70. Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Aanderud, Z., Lennon, J., Fierer, N., 2013. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME J.* 7, 1641-1650. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.50>
71. Lazarovits, G., 2010. Managing soilborne disease of potatoes using ecologically based approaches. *Am. J. Potato Res.*, 87, 401–411.
72. Legrand, F., Picot, A., Cobo-Díaz J.F., Carof, M., Chen, W., Le Floch, G., 2018. Effect of tillage and static abiotic soil properties on microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* 132, 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.016>.

73. Lhemann, J., Kleber, M., 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, 528, 60-68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>.
74. Li, J., Wang, E., Wang, Y., Xing, H., Wang, D., Wang, L., Gao, C., 2016. Reducing greenhouse gas emissions from awheat–maize rotation system while still maintaining productivity. *Agric. Syst.* 145, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2016.03.007>.
75. Lichter, K., Govaerts, B., Six J., Sayre, K., Deckers, J., Dendooven, L., 2008. Aggregation and C and N contents of soils organic matter fractions in a permanent raised-bed planting system in the Highlands of Central Mexico. *Plant Soil*, 305, 237-252.
76. Lladó, S., López-Mondéjar, R., Baldrian, P., 2018. Drivers of soil microbial community structure in forest soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 4331-4338. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8950-4>.
77. Ludueña, L.M., Anzuay, M.S., Angelini, J.G., McIntosh, M., Becker, A., Rupp, O., Goesmann, A., Biom, J., Fabra, A., Taurian, T., 2018. Strain *Serratia* sp, S119: A potential biofertilizer for peanut and maize and a model bacterium to study phosphate solubilization mechanisms. *App. Soil Ecol.* 126, 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.024>.
78. Lüneberg, K., Schneider, D., Siebe, C., Daniel, R., 2018. Drylands soil bacterial community is affected by land use change and different irrigation practices in the Mezquital Valley, Mexico. *Sci. Reports*, 8, 1413. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19743-x>.
79. Maarastawi, S.A., Frindte, K., Linnartz, M., Knief, C., 2018. Crop rotation and straw application impact microbial communities in Italian and Philippine soils and the rhizosphere of *Zea mays*. *Front. Microb.* 9, 1295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01295>.
80. Mair, P., Wilcox, R.R., 2017. Robust statistical methods using WRS 2. Version: 0.9-2, Date 2017-04-29. <https://CRAN.R-project.org/package=wrs2>.
81. Marinari S., Masciandaro G., Ceccanti B., Grego S., 2000. Influence of organic and mineral fertilizers on soil biological and physical properties. *Bioresour. Technol.*, 72, 9–17.

82. Maron, P.A., Mougél, C., Ranjard, L., 2011. Soil microbial diversity: methodological strategy, spatial overview and functional interest. *C. R. Biol.*, 334, 403-11.
83. Martin K., Sauerborn J., 2013. Origin and development of agriculture. En: *Agroecology*. Ed. Springer. pp. 9–48.
84. Martínez, O.A., Encina, C., Tomckowiac, C., Droppelmann, F., Jara, R., Constaza, Maldonado, C., Muñoz, O., García-Fraile, P., Rivas, R., 2018. *Serratia* strains isolated from the rhizosphere of raulí (*Nothofagus alpina*) in volcanic soils harbour PGPR mechanism and promote raulí plantlet growth. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 18(3), 804-819.
85. Masunga, R.H., Uzokwe, V.N., Mlay, P.D., Odeh, I., Singh, A., Buchan, D., De Neve, S., 2016. Nitrogen mineralization dynamics of different valuable organic amendments commonly used in agriculture. *Appl. Soil Ecol.* 101, 185-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.01.006>.
86. Mathew, R.P., Feng, Y., Githinji, L., Ankumah, R., Balkcom, K.S., 2012. Impact of No-tillage and conventional tillage systems on soil microbial communities. *Appl. Environ. Soil Sc.*, 2012, 1–10.
87. McSpadden Gardener, B.B., 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94, 1252-1258.
88. Meena, V.S., Maurya, B.R., Meena, S.K., Meena, R.K., Kumar, A., Verma, J.P., Singh, N.P., 2016. Can *Bacillus* Species Enhance Nutrient Availability in Agricultural Soils? In: Islam M., Rahman M., Pandey P., Jha C., Aeron A. (Eds) *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3>.
89. Moreno-Espíndola, I.P., Ferrara-Guerrero, M.J., Luna-Guido, M.L., Ramírez-Villanueva, D.A., De León-Lorenzana, A.S., Gómez-Acata, S.E., González-Terreros, E., Ramírez-Barajas, B., Navarro-Noya, Y.E., Sánchez-Rodríguez, L.M., Fuentes-Ponce, M., Macedas-Jimenez J.U., Dendooven, L., 2018. The bacterial community structure and microbial activity in a traditional organic milpa farming system under different soil moisture conditions. *Front. Microbiol.* 9, 2737. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02737>.
90. Moreno, J.L., Torres, I.F., García, C., López-Mondéjar, R., Bastida, F., 2019. Land use shapes the resistance of the soil microbial community and the C

- cycling response to drought in a semi-arid area. *Sci. Total Environ.* 648, 1018-1030. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.214>.
91. Mulvaney, R.L., 1996. Nitrogen-inorganic forms. In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H. (Eds.), *Methods of soil of soil analysis Part 3-Chemical methods book series no. 5.* Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.frontmatter>.
92. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.009>.
93. Nesme, J., Achouak, W., Agathos, S.N., Bailey, M., Baldrian, P., *et al.*, 2016. Back to the future of soil metagenomics. *Front. Microb.* 7(73). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00073>.
94. Nivellet E., Verzeax J., Habbib H., Kuzyakov Y., Decocq G., Roger D., Lacoux J., Duclercq J., Spicher F., Nava-Saucedo J.E., Catterou M., Dubois F., Tetu T., 2016. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Appl. Soil Ecol.*, 108, 147–155.
95. O'Brien, S.L., Gibbons, S.M., Owens, S.M., Hampton-Marcel, J., Johnston, E.R., Jastrow, J.D., Gilbert, J.A., Meyer, F., Antonopoulos, D.A., 2016. Spatial scale drives patterns in soil bacterial diversity. *Environ. Microbiol.* 18(6), 2039-2051. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13231>.
96. Ogle S.M., Breidt F.J., Paustian K., 2005. Agricultural management impacts on soil organic carbon storage under moist and dry climatic conditions of temperate and tropical regions. *Biogeochemistry*, 72, 87– 121.
97. Oksanen, J.F., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2017. Vegan package in R. *Community Ecology Package*, Version: 2.4-4, Date 2017-08-24. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

98. Ortiz-Álvarez, R., Fierer, N., de los Rios, A., Casamayor, E.O., Barberán, A., 2018. Consistent changes in the taxonomic structure and functional attributes of bacterial communities during primary succession. *ISME J.* 12, 1658-1667. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0076-2>.
99. Plourde, D.J., Pijanowski, C.B., Pekin, K.B., 2013. Evidence for increased monoculture cropping in the Central United States. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 165, 50–59.
100. Powlson, D.S., Stirling, C.M., Thierfelder, C., White R.P., Jat, M.L., 2016. Does conservation agriculture deliver climate change mitigation through soil carbon sequestration in tropical agro-ecosystems?. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 220, 164–174.
101. Preece, C., Verbruggen, E., Liu, L., Weedon, J.T., Peñuelas, J., 2019. Effects of past and current drought on the composition and diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 131, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.022>.
102. Prince, L., Verhulst, N., Govaerts, B., Navarro-Noya, Y.E., Dendooven, L., 2020. Wet or dry sowing had a larger effect on the soil bacterial community composition than tillage practices in an arid irrigated agro-ecosystem. *J. Soil Sediment*, 20, 3316-3329. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02626-y>.
103. R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>.
104. 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. Cy.* 22, GB1003. <https://doi.org/10.1029/2007GB002952>
105. 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 amended soil with contrasting management practices. *Appl. Soil Ecol.* 90, 49-59.
106. Renard, D., Birk, J.J., Zangerlé, A., Lavelle P., Glaser, B., Blatrix, R., McKey, D., 2013. Ancient human agricultural practices can promote activities

- of contemporary non-human soil ecosystem engineers: A case study in coastal savannas of French Guiana. *Soil Biol. Biochem.*, 62, 46–56.
107. Repullo, M.A., Carbonell, R., Hidalgo, J., Rodríguez-Lizana, A., Ordóñez, R., 2012. Using olive pruning residues to cover soil and improve fertility. *Soil Till. Res.* 124, 36–46.
 108. Rhoades, J.D., Manteghi, N.A., Shouse, P.J., Alves, W.J., 1989. Estimating soil salinity from saturated soil-paste electrical conductivity. *Soil Sci. Am. J.* 53, 428-433.
 109. Rillig, M.C., Lehmann, A., Aguilar-Trigueros, C.A., Antonovics, J., Caruso, T., Hempel, S., Lehmann, J., Valyi, K., Verbruggen, E., Veresoglou, S.D., Powell, J.R., 2016. Soil microbes and community coalescence. *Pedobiologia*, 59, 37-40. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2016.01.001>.
 110. Ruíz-Valdiviezo, V.M., Luna-Guido, M., Galzy, A., Gutierrez-Miceli, F.A., Dendooven, L., 2010. Greenhouse gas emissions and C and N mineralization in soils of Chiapas (Mexico) amended with leaves of *Jatropha curcas* L. *Appl. Soil Ecol.* 46, 17–25.
 111. Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
 112. Sayyed, R.Z., Seifi, S., Patel, P.R., Shaikh, S.S., Jadhav, H.P., Enhasy, H.E., 2019. Siderophore production in groundnut rhizosphere isolates, *Achromobacter* sp. RZS2 influenced by physicochemical factors and metal ions. *Environ. Sustain.* 2, 117-124. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00070-4>.
 113. Schloter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S.J., van Elsas, J.D., 2018. Microbial indicators for soil quality. *Biol. Fertil. Soils* 54, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1248-3>.
 114. Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, M., Kógel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., Nannipieri, P., Rasse, D.P., Weiner, S., Trumbore, S.E., 2011. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478, 49-56. <http://doi.org/10.1038/nature10386>.
 115. Shade, A., Gilbert, J.A., 2015. Temporal patterns of rarity provide a more complete view of microbial diversity. *Trends Microbiol.* 23(6), 335-340. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.007>.

116. Shade, A., Jones, S., Caporaso, J.G., Handelsman, J., Knight, R., Fierer, N., Gilbert, J.A., 2014. Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity. *mBio* 5(4), e01371-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01371-14>.
117. Shahbaz, M., Kuzyakov, Y., Heitkamp, F., 2017. Decrease of soil organic matter stabilization with increasing inputs: mechanisms and controls. *Geoderma* 304, 76-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.05.019>.
118. Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379-423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
119. Shukla, M., Lal, R., y Erbinge. M., 2006. Determining soil quality indicators by factor analysis. *Soil Till. Res.*, 87(2), 194–204.
120. Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163:688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>.
121. Soil Survey Staff, 2003. Keys to soil taxonomy, 9na ed. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Washington, D. C., USA.
122. Squire G.R., Hawes C., Valentine T.A., Young M.W., 2015. Degradation rate of soil function varies with trajectory of agricultural intensification. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 202, 160–167.
123. Sun R., Zhang, X.X., Guo X., Wang D., Chu H., 2015. Bacterial diversity in soils subjected to long- term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock manure tan wheat Straw. *Soil Biol. Biochem.*, 88, 9–18.
124. Sun, R., Li, W., Dong, W., Tian, Y., Hu, C., Liu, B., 2018. Tillage changes vertical distribution of soil bacterial and fungal communities. *Front. Microbiol.* 9, 699. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00699>.
125. Tao, J., Meng, D., Qin, C., Liu, X., Liang, Y., Xiao, Y., Liu, Z., Gu, Y., Li, J., Yin, H., 2018. Integrated network analysis reveals the importance of microbial interactions for maize growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3805-3818. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8837-4>.
126. Thierfelder, C., Wall, P.C., 2010. Investigating Conservation Agriculture (CA) Systems in Zambia and Zimbabwe to mitigate future effects of climate change. *J. Crop Improv.* 24, 113–121.

127. Thomas, G.W., 1996. Soil pH and soil acidity. In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H. (Eds.), *Methods of soil of soil analysis Part 3- Chemical methods book series no. 5*. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.frontmatter>.
128. Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677.
129. Tripathi, B.M., Moroenyane, I., Sherman, C., Lee, K.Y., Adams, J.M., Steinberger, Y., 2017. Trends in taxonomic and functional composition of soil microbiome along a precipitation gradient in Israel. *Microb. Ecol.* 74, 168-176. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0931-0>.
130. Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Anderson, I.C., Singh, B.K., 2016. Response of soil properties and microbial communities to agriculture: Implications for primary productivity and soil health indicators. *Front. Plant Sci.* 7, 990. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00990>.
131. Upton, R.N., Bach, E.M., Hofmockel, K.S., 2019. Spatio-temporal microbial community dynamics within soil aggregates. *Soil Biol. Biochem.* 132, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.01016>.
132. Valboa, G., Lagomarsino, A., Brandi, G., Agnelli, A.E., Simoncini, S., Papini, R., Vignozzi, N., Pellegrini, S., 2015. Long-term variations in soil organic matter under different tillage intensities. *Soil Tillage Res.* 154, 126-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.201506.017>.
133. Vandermeer, J., Perfecto, I., 2007. The diverse faces of ecosystems engineers in agroecosystems. En: Cuddington K., Byers J.E., Wilson W.G., Hastings A., *Ecosystem engineers: Plants to protists*. Ed. Academic Press, Burlington, Vermont, USA., pp, 367–386.
134. Verhulst, N., Nelissen, V., Jespers, N., Haven, H., Sayre, K.D., Raes, D., Deckers, J., Govaerts, B., 2011b. Soil water content, maize yield and its stability as affected by tillage and crop residue management in rainfed semi-arid highlands. *Plant Soil* 344, 73-85. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0728-8>.
135. Verhulst, N., Sayre, K.D., Vargas, M., Crossa, J., Deckers, J., Raes, D., Govaerts, B., 2011a. Wheat yield and tillage-straw management system × year

- interaction explained by climatic co-variables for an irrigated bed planting system in northwestern Mexico. *Field Crops Res.* 124, 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.07.002>.
136. Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F., van der Heijden, M.G.A., 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *PNAS* 14(111), 5266-5270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320054111>.
137. Wang, G., Huang, W., Mayes, M.A., Liu, X., Zhang, D., Zhang, Q., Han, T., Zhou, G., 2019. Soil moisture drives microbial controls on carbon decomposition in two subtropical forests. *Soil Biol. Biochem.* 130, 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.017>.
138. Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261-5267.
139. Wang, Q., Wang, S., He, T., Liu, L., Wu, J., 2014. Response of organic carbon mineralization and microbial community to leaf litter and nutrient additions in subtropical forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 71, 13-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.01.004>.
140. Wang, S., Wang, X., Han, X., Deng, Y., 2018. Higher precipitation strengthens the microbial interactions in semi-arid grassland soils. *Global Ecol. Biogeogr.* 27, 570-580. <https://doi.org/10.1111/geb.12718>.
141. Ward, B.B., Jensen, M.M., 2014. The microbial nitrogen cycle. *Frontiers in Microbiology* 5, 5531-5532. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00553>.
142. Wu, J., Xiong, J., Hu, C., Shi, Y., Wang, K., Zhang, D., 2015. Temperature sensitivity of soil bacterial community along contrasting warming gradient. *Appl. Soil Ecol.* 94, 40-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.018>.
143. Wu, Y., Lu, L., Wang, B., Lin, X., Zhu, J., Cai, Z., Yan, X., Jia, Z., 2011. Long-term field fertilization significantly alters community structure of ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in a paddy soil. *Soil Biol. Biochem.* 75(4), 1431-1439.
144. Xue, P.P., Carrillo, Y., Pino, V., Minasny, B., McBratney, A.B., 2018. Soil properties drive microbial community structure in a large scale transect in

- South Eastern Australia. *Sci. Reports* 8, 11725. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30005-8>.
145. Yin, C., Jones, K.L., Peterson, D.E., Garrett, K.A., Hulbert, S.H., Paulitz, T.C., 2010. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.*, 42, 2111–2118.
146. Yu, X., Polz, M.F., Alm, E.j., 2018. Interactions in self-assembled microbial communities saturate with diversity. *ISME J.* <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0356-5>.
147. Zalidis, G., Stamatiadis, S., Takavakoglou, V., Eskridge, K. y Misopolinos, N., 2002. Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88(2), 137–146.
148. Zhang, Q., Wu, J., Yang, F., Lei, Y., Zhang Q., Cheng, X., 2016. Alterations in soil microbial community composition and biomass following agricultural land use change. *Sci. Reports*, 6, 36587. <https://doi.org/10.1038/srep36587>.
149. Zhou, J., Jiang, X., Wei, D., Zhao, B., Ma, M., Chen, S., Cao, F., Shen, D., Guan, D., Li, J., 2017. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in black soil for two crop seasons in China. *Sci. Reports* 7(1), 3267. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03539-6>.

11. Apéndice

Apéndice 1. De los análisis fisicoquímicos del suelo

Capacidad de retención de agua (WHC) (Cassel y Nielsen, 1986).

1. Pesar una pieza de papel filtro Whatman no. 42 de 10 x 10 cm.
2. En un embudo, colocar el papel filtro y adicionar 50 g de suelo secado al aire.
3. Adicionar agua destilada hasta inundar el suelo por completo.
4. Cubrir con aluminio la muestra y el embudo evitando la evaporación.
5. Dejar reposar por 24 h y pesar el papel filtro junto con el suelo húmedo.

Cálculos

$$\text{WHC (g kg}^{-1}\text{)} = ((W_t - (p_f * F_{pf}) - W_{SS}) * 1000) / W_{SS}$$

Donde: W_t : Peso total drenado 24 h (papel filtro húmedo más suelo húmedo)

P_f : Peso del papel filtro inicial (seco)

F_{pf} : Factor de retención de agua del papel filtro, se obtiene con blancos de papel filtro saturados con agua y dispuestos de la misma manera en embudos con cubiertos con aluminio, drenados por 24 h. $F_{pf} = \text{peso pf húmedo (24 h drenado)} / \text{peso pf seco (inicial)}$.

W_{SS} : Peso del suelo seco.

Determinación de textura (Gee y Bauder, 1986).

1. Eliminación de materia orgánica: En caso de que las muestras tengan un alto contenido de materia orgánica, se adiciona H_2O_2 y se permite su evaporación, repitiendo este procedimiento hasta que no se observe la formación de efervescencia.
2. Pesar 50 g de suelo secado al aire.
3. Agregar aproximadamente 600 ml de agua destilada y colocar en un vaso de mezclado 19 ml de dispersante (hexametáfosfato de sodio 50 g l).
4. Agitar por 2 minutos
5. Verter a una probeta de 1 l y aforar con agua destilada.
6. Agitar por inversión por 1 minuto para homogeneizar, reposar 40 segundos y tomar la primera lectura de temperatura y del hidrómetro.

7. Dejar reposar por 2 h y realizar la segunda lectura del hidrómetro y de la temperatura.

Cálculos

$\% \text{ de limo} + \% \text{ de arcillas} = (1a \text{ lectura} + ((T1 - 20) * 0.36)) * 100/g \text{ de suelo}$
 $\% \text{ de arena} = 100 - (\% \text{ de limo} + \% \text{ de arcilla})$
 $\% \text{ de arcilla} = (2a \text{ lectura} + ((T2 - 20) * 0.36)) * 100/g \text{ de suelo}$

pH (Thomas, 1996).

1. Pesar 10 g de suelo en un vaso de precipitado y adicionar 25 ml de agua destilada.
2. Agitar con magneto durante 10 min.
3. Dejar reposar por 10 min.
4. Leer con potenciómetro calibrado.

Conductividad electrolítica (Rhoades et al., 1989)

1. Pesar 200 g de suelo y adicionar c. B. P 100 % de CRA, mezclar hasta homogeneizar.
2. Reposar por 24 h en refrigeración.
3. Centrifugar a 3500 rpm durante 30 min.
4. Extraer el sobrenadante y leer en conductímetro, calibrando con los estándares respectivos.

Determinación de carbono total (TOC) (Amato M., 1983)

1. Preparar soluciones de: - NaOH 1M Mezcla digestora:
 H_2SO_4 conc. 60 ml- H_3PO_4 conc. 40 ml- $K_2Cr_2O_7$ 5 g.
2. Adicionar el suelo secado al horno (80°C 24 h) al fondo del tubo de ensaye de 2.5 x 2.5 cm.
3. Colocar un bastoncillo de vidrio en el fondo del tubo
4. Adicionar 20 ml de mezcla digestora al tubo anterior, evitando que toque las paredes del tubo.
5. Colocar un tubo de ensaye con rosca con 20 ml de NaOH 1M.
6. Tapar inmediatamente con un sub-seal y calentar paulatinamente hasta que alcance una temperatura de 130°C, manteniendo esta temperatura por varias horas y hasta que no se observe la producción de burbujas en la mezcla digestora.

7. Dejar reposar por 24 h y titular la solución de NaOH para HCO_3^-

Humedad relativa (WC) (Ruíz-Valdiviezo et al., 2010).

1. En un capacillo o placa Petri a peso seco se adicionan 10g de suelo fresco.
2. El capacillo con el suelo se introducen al horno a 80°C hasta que alcancen peso constante.

Cálculos

$$\text{WC} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso Final} / \text{Peso de la muestra}) \times 100$$



Changes in the bacterial community structure in soil under conventional and conservation practices throughout a complete maize (*Zea mays* L.) crop cycle

Edson A. Romero-Salas^a, Yendi E. Navarro-Noya^b, Marco Luna-Guido^a, Nele Verhulst^c, José Crossa^c, Bram Govaerts^{c,d}, Luc Dendooven^{a,*}

^a Laboratory of Soil Ecology, ABACUS, Cuernavaca, Mexico City 07360, Mexico

^b CONACYT-Tlaxcala Autonomous University, Tlaxcala, Tlaxcala 90000, Mexico

^c International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Apdo. Postal 6-641, 06600 Mexico City, Mexico

^d Cornell University, Ithaca, USA



ARTICLE INFO

Keywords:

Crop residue management
Long-term field experiment
Maize monoculture and wheat-maize crop rotation
Soil characteristics
Tillage

ABSTRACT

Agricultural practices and changes in soil conditions, such as water content, inorganic N content, temperature, pH and organic material availability, affect the bacterial community structure. Soil characteristics and the bacterial community structure were monitored in soil with maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) rotation, zero tillage and crop residue kept (ZTRK) or removed (ZTRR), and conventional tillage with monoculture maize (CTMR) or maize-wheat rotation and crop residue removed (CTRR) or kept in the field and ploughed in (CTRK). The soil organic C was significantly affected by tillage practices and decreased ZTRK > CTRK > CTRR = ZTRR > CTMR, while water content and NO₃⁻ concentration showed large fluctuations over the crop cycle, but were not affected significantly by agricultural practices. The bacterial community structure showed large changes over the crop cycle determined by varying soil characteristics, most importantly water content and NO₃⁻ concentration and six bacterial genera, i.e. *Achromobacter*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Kaistobacter*, *Pseudomonas* and *Serratia*, while changes due to agricultural practices were much smaller. It was found that the bacterial community structure was affected significantly by time, tillage (zero tillage versus conventional tillage), crop residue management (kept versus removed) and crop rotation (CTMR versus CTRR treatment).

1. Introduction

Soil conditions, such as pH, water content, temperature, available organic material and N fertilizer application, control the bacterial community structure (Jangid et al., 2008; Fierer, 2017). Complex interactions between these factors drive changes in soil bacterial communities and their functioning (Wu et al., 2015; Xue et al., 2018). Water content is one of the major factors affecting soil microorganisms (Wang et al., 2019). An excess of water reduces gas fluxes and results in a decrease in oxygen (O₂) content in soil, creating anaerobic conditions, which favors facultative and obligate anaerobes; while a lack of water enriches microorganisms that can survive with little or no water (Yan et al., 2015; Schimel, 2018). Microbial activity is affected by temperature, but the optimum for growth is highly variable between them. Organic material left in the field, such as crop residue, facilitates water infiltration, prevents erosion and limits evaporation, but also serves as a carbon source for heterotrophs (Fernández et al., 2016). The

composition and availability of the organic material will determine which microorganisms will be enriched in soil (Valboa et al., 2015; Zhang et al., 2016). Copiotrophs are enriched when easily decomposable organic material is applied to soil, while oligotrophs are enriched in nutrient poor environments (Giovannoni et al., 2014). Crop residue removal or leaving it on the soil surface limits the amount of C substrate available for heterotrophs, while ploughing brings it in direct contact with microorganisms accelerating organic material mineralization (Carbonetto et al., 2014; Dimassi et al., 2014). Tillage breaks up aggregates so the organic material physically protected becomes available for microorganisms thereby reducing the soil organic matter content (Abdollahi and Munkholm, 2014; Shahbaz et al., 2017). Inorganic N fertilizer application, such as urea or ammonium, might stimulate the activity of nitrifiers (Wu et al., 2011). Additionally, some soil organic material is low in N, i.e. it has a high C-to-N ratio, and so its mineralization is delayed (Marschner et al., 2003; Wang et al., 2014). Application of inorganic N fertilizer will increase the soil mineral N

* Corresponding author.

E-mail address: dendooven@me.com (L. Dendooven).

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103733>

Received 8 October 2019; Received in revised form 30 June 2020; Accepted 2 August 2020

0929-1393/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).