

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Tesina de Graduación de la Licenciatura en Bioquímica

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE VINAZA EN CULTIVOS DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA DEL SUELO

Pablo Fernández Garelo

Tutora: Mag. Natalia Bajsa
Co-tutora: Dra. Sandra Lupo

Laboratorio de Ecología Microbiana.
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Laboratorio de Micología.
Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería.
UdelaR.

Montevideo, Febrero de 2012

Agradecimientos

A Natalia por guiarme en este proceso, por el constante aprendizaje, dedicación, paciencia y apoyo en todo momento.

A Sandra por todo el conocimiento que me brindó de los hongos, la ayuda, apoyo y dedicación.

A Daniella por toda la ayuda, dedicación y apoyo para realizar este trabajo.

A Lis por ese llamado y la oportunidad de que pueda hacer lo que tanto me gusta.

A Lina por toda la ayuda con la identificación de los hongos.

A Lyliam por toda la ayuda, apoyo y disposición.

A todos los compañeros de LEM, MICROMOL y BIOGEM.

A todos los compañeros del laboratorio de micología y el laboratorio de bioingeniería.

Al personal de ALUR.

A los compañeros y amigos que recorrimos juntos este camino.

A mis padres y hermano por el apoyo incondicional.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Productos y derivados agroindustriales	2
2. Sistemas agrícolas	3
3. Microorganismos del suelo	4
3.1 Actinobacterias	5
3.2 Hongos filamentosos	6
4. Consideraciones finales	7
OBJETIVOS	9
1. Objetivo general	9
2. Objetivos específicos	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Sitios de muestreo	10
2. Obtención de muestras de suelo	11
3. Análisis de las muestras	12
3.1. Humedad	12
3.2. Recuentos bacterianos	12
3.3. Recuento de hongos filamentosos	13
3.4. Obtención de aislamientos fúngicos	13
3.5. Identificación	13
3.5.1. <i>Penicillium</i> spp. y <i>Eupenicillium</i> spp.	14
3.5.2. <i>Fusarium</i> spp.	14
3.5.3. <i>Trichoderma</i> spp.	14
4. Análisis de datos	15
4.1. Recuentos microbianos	15
4.2. Comunidad de hongos filamentosos	15
4.2.1. Densidad relativa	15
4.2.2. Análisis de correspondencia	15
4.2.3. Porcentaje de mínima similitud	16
RESULTADOS	17
1. Abundancia de bacterias cultivables en suelos con diferentes dosis de vinaza aplicada	17
2. Abundancia de hongos filamentosos	24
3. Identificación de hongos filamentosos	27
3.1. Índice de mínima similitud	34
3.2. Análisis de correspondencia para hongos filamentosos	35
DISCUSIÓN	38
1. Abundancia de bacterias cultivables en suelos con diferentes dosis de vinaza aplicada	38
2. Abundancia y estructura de la comunidad de hongos filamentosos	40

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

43

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

44

RESUMEN

Junto con la producción de bioetanol se obtiene una cantidad significativa de subproductos, que pueden ser una problemática si no son manejados o utilizados adecuadamente. La vinaza es un residuo líquido generado durante la producción de etanol a partir de la caña de azúcar. Debido a la elevada carga en materia orgánica se torna inviable su vertido sin previo tratamiento a un curso de agua. Por otra parte, el contenido en minerales que la vinaza posee podría suplir en mayor o menor medida varios requerimientos nutritivos de diferentes cultivos. La opción de usar la vinaza como fertilizante es una alternativa al tratamiento de la misma. Los microorganismos cumplen funciones esenciales en el sistema edáfico y a su vez son sensibles a las alteraciones del mismo. Comprender el efecto de las alteraciones sobre la comunidad microbiana y su funcionamiento puede contribuir a conservar la calidad del suelo para un desarrollo sustentable de los agroecosistemas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de vinaza en dos tipos de suelo con cultivos de caña de azúcar sobre la abundancia de bacterias heterótrofas, actinobacterias y hongos filamentosos. También se evaluó el efecto sobre la diversidad de hongos filamentosos. Para esto se realizó un experimento con cuatro parcelas por sitio, tratadas con 0, 150, 300 y 450 m³/há de vinaza. Se determinó que la población de actinobacterias en el sitio 1 aumentó con la aplicación de 300 y 450 m³/há de vinaza mientras que esta población no se vio afectada en el sitio 2. La abundancia de hongos filamentosos aumentó con 450 m³/há de vinaza en el sitio 1 mientras que disminuyó con esa misma dosis en el sitio 2. La población de bacterias heterótrofas totales no mostró diferencias en ninguno de los sitios. No se pudo observar un comportamiento específico de la vinaza sobre la estructura de la comunidad de hongos filamentosos, pero se determinó que la misma cambió con la aplicación de vinaza. El resultado en común entre ambos tipos de suelos fue el incremento de *Eupenicillium brefeldianum* con la aplicación de 150 m³/há de vinaza. Los resultados obtenidos indican que la vinaza genera efectos diferentes sobre diferentes tipos de microorganismos. A su vez los efectos dependen de la dosis y del tipo de suelo en la que es aplicada.

INTRODUCCIÓN

1. Productos y derivados agroindustriales

El interés por el uso de fuentes energéticas renovables como alternativa a la disminución o sustitución de combustibles de origen fósil y la creciente preocupación por el ambiente, han llevado a numerosos acuerdos entre muchos países para fomentar el desarrollo de energías alternativas renovables de menor impacto ambiental (PNUMA, 2010). Siguiendo las tendencias ambientales, en 2005 ALUR (Alcoholes del Uruguay) retomó la idea de un Proyecto Sucroalcoholero en Bella Unión y al año siguiente inauguró la primera zafra azucarera. En el año 2007, se aprueba la Ley Nº 18.195 que promueve la producción de agrocombustibles y establece que a partir de ese año, ANCAP debe incorporar etanol carburante (producido en el país y con materia prima nacional) en una proporción de hasta el 5 % en las gasolinas de uso automotriz que se comercialicen internamente hasta el 31 de diciembre de 2014 y ese mínimo obligatorio se elevará a 5 % a partir de dicha fecha (ALUR, 2012).

Al momento, la principal fuente de bioetanol en Uruguay es el cultivo de caña de azúcar. Este cultivo se encuentra localizado exclusivamente en el departamento de Artigas. El número total actual de productores que explotan el rubro es de 307 y el área total estimada a cosecharse es de 6.644 hectáreas, con una producción probable de 380.000 toneladas. Parte de las mismas son utilizadas para la producción de etanol (Errea y Méndez, 2011). De esta forma, el bioetanol y sus derivados van tomando fuerte importancia en el país.

Junto con la producción de bioetanol se genera una cantidad significativa de subproductos, que pueden ser una problemática si no son manejados o utilizados adecuadamente. La vinaza es un residuo líquido generado durante la producción de etanol a partir de la caña de azúcar en una proporción de 14 litros por litro de alcohol generado (Cuellar *et al.*, 2002). Puesto que su origen es la planta de caña, la misma posee un alto contenido en materia orgánica, potasio, calcio, magnesio, azufre y nitrógeno (Hernández *et al.*, 2008). A causa de su elevado volumen, muchos países han buscado alternativas para el tratamiento de la misma. El uso en la agricultura ha sido una de estas alternativas debido a su alto contenido en nutrientes que pueden complementar las necesidades de elementos mayores y menores en los cultivos al ser aplicada como fertilizante (Korndörfer, 2007; Valdés, 2007; Montenegro *et al.*, 2009).

Dado que la producción de residuos es imposible de evitar, se trata en la actualidad, de minimizar o de reutilizar los mencionados restos empleándolos de manera racional, reciclandolos o dándoles aplicaciones de carácter secundario que favorezcan el proceso de asimilación o destrucción de los mismos. Así se evitan los efectos negativos sobre el ambiente manteniendo los equilibrios ecológicos naturales (Álvarez *et al.*, 2007). En base a esto, los bioproductos originados de procesos agroindustriales representan una interesante fuente de nutrientes para la agricultura (Tejada y González, 2005).

2. Sistemas agrícolas

La sostenibilidad de la agricultura exige, hoy más que nunca, ajustar los costos de producción pero además debe minimizar los inevitables efectos negativos que la fertilización, como cualquier otra actividad, tiene sobre el ambiente. La fertilización del suelo está destinada a restablecer, conservar o acrecentar el potencial productivo del mismo, para que las plantas que se cultiven tengan todos los aportes de nutrientes que requieren y así puedan desarrollarse adecuadamente (Salamanca, 2008). Asimismo, el suelo debe entenderse como un sistema complejo con propiedades físicas, químicas y biológicas que son de capital importancia para el logro de un desarrollo óptimo de los cultivos (González y Pomares, 2008).

La adición de residuos orgánicos tales como estiércol animal, desechos de ciudades, compost o bioproductos industriales sobre suelos agrícolas se ha convertido en una práctica muy común debido a las mejoras observadas en las propiedades del suelo (Tejada y González, 2005). De todas formas, cualquier tipo de práctica que pueda generar alteraciones sobre el sistema edáfico debe de ser evaluada. La degradación o la restauración de los suelos podrían ser evaluadas a través del análisis de las propiedades que determinan las principales funciones del mismo, en particular las propiedades que respondan a los cambios en el manejo (Doran y Zeiss, 2000).

Los microorganismos son sensibles a las alteraciones tales como las generadas en la agricultura, contaminación u otro tipo de estrés. Comprender el efecto de las alteraciones sobre la diversidad microbiana y el funcionamiento puede contribuir a comprender la calidad del suelo para un desarrollo sustentable de los agroecosistemas (Kennedy y Smith, 1995; Kennedy, 1999).

3. Microorganismos del suelo

Una de las mayores propiedades del suelo es ser el hábitat para numerosos y diversos organismos, permitiendo el ensamblaje de actividades que tienen lugar en él. Los microorganismos del suelo están involucrados en los principales procesos del mismo tales como la humificación la cual genera la estructuración del suelo, el ciclado de nutrientes y la mineralización de residuos orgánicos, aumentando la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Emmerling *et al.*, 2002). Un simple gramo de suelo contiene 10^5 - 10^8 bacterias, 10^6 - 10^7 actinobacterias y 10^5 - 10^6 hongos filamentosos (Murphy *et al.*, 2007). Sin embargo en términos de biomasa los hongos son dominantes seguidos por las bacterias y finalmente las actinobacterias. Esto es debido principalmente al tamaño de los mismos (Venkateswarlu y Srinivasarao, 2005).

Los microorganismos no se encuentran distribuidos regularmente en el suelo, si no que hay un mosaico discontinuo de microambientes. Aquellos favorables para el crecimiento microbiano se caracterizan por su limitada extensión en el tiempo y en el espacio. La disposición de los microorganismos, con excepción de los fotótrofos, sigue la distribución vertical de los nutrientes pero es alterada por varios factores tales como el pH, la humedad, la cantidad de minerales asimilables y la presencia de sustancias antimicrobianas (Carrillo, 2003).

Dos parámetros son importantes cuando se evalúa la significancia de los microorganismos en el suelo, la abundancia y la diversidad. Mientras que la abundancia puede aumentar o disminuir en cortos períodos en respuesta a diferentes prácticas de manejo, la diversidad es más importante para poder comprender la significancia funcional de los microorganismos en un sitio dado. Las investigaciones en el manejo de suelos y cultivos han ayudado a comprender el impacto de varios factores naturales y prácticas agrícolas sobre las poblaciones y diversidad de microorganismos del suelo. Las prácticas de manejo del suelo en general, y particularmente aquellas que influyen en la fertilidad, tienen un impacto inmediato sobre las poblaciones microbianas (Venkateswarlu y Srinivasarao, 2005).

Los microorganismos en suelos agrícolas son conocidos por ejercer profundas influencias en la de fertilidad del suelo, en particular con respecto a la disponibilidad de nutrientes para las plantas, como también la supresión de patógenos del suelo que causan enfermedades de las plantas (Kennedy y Smith, 1995).

Se ha postulado que disturbios en el sistema puede no generar grandes efectos sobre los microorganismos del suelo debido a la redundancia de las actividades presentes

en el mismo (Turco *et al.*, 1994; Kennedy y Smith, 1995). Sin embargo este postulado puede cambiar cuando se consideran aspectos específicos del suelo. La congruencia de esto es que cada miembro individual de la comunidad microbiana juega un rol específico en el nicho específico y ese rol puede no ser fácilmente reemplazable por otros organismos presentes en el sistema. Por ejemplo la supresión de fitopatógenos puede estar mediada por un pequeño grupo de microorganismos (van Elsas *et al.*, 2002). Incluso, si un organismo es redundante en una función, los cambios generados pueden actuar sobre otras de sus funciones. Por otra parte organismos con la misma función pueden presentar diferentes susceptibilidades y tolerancias al estrés biótico y abiótico. Esto es de gran importancia ya que una población diversa de organismos tendrá mayor resiliencia a un estrés dado y tendrá mayor capacidad de adaptarse frente a los cambios ambientales (Kirk *et al.*, 2004).

En orden de comprender los efectos que el manejo de agrosistemas tiene sobre las funciones del suelo, es primordial comprender los efectos sobre la microbiota del mismo tales como las interacciones, cambios en la estructura de la comunidad y sus actividades (van Elsas *et al.*, 2002).

3.1 Actinobacterias

En términos de número y variedad de especies identificadas, el *Phylum Actinobacteria* representa una de las más grandes unidades taxonómicas entre los 18 mayores linajes actualmente reconocidos dentro del dominio *Bacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997), incluyendo 5 subclases y 14 subórdenes (Stackebrandt, 2000). Estas comprenden bacterias Gram-positivas con un alto contenido en G+C en su ADN, que puede ir desde 51% a más del 75% (Ventura *et al.*, 2007).

Morfológicamente exhiben una amplia variedad de estructuras de crecimiento, desde simples células en bastones o cocos hasta desarrollo micelial (Paul, 2007), muy característico de este grupo de bacterias. También presentan una gran diversidad de propiedades fisiológicas y metabólicas, tales como la producción de enzimas extracelulares y una gran variedad de metabolitos secundarios. Varios de estos metabolitos son antibióticos, principalmente producidos por el género *Streptomyces* por lo que desde hace varios años han tenido una importante atención (Miao y Davies, 2010).

Con una capacidad metabólica muy extensa, pudiendo ser heterótrofos, autótrofos, quimiótrofos o fotótrofos y tanto aerobios como anaerobios, estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en ecosistemas naturales. Han sido aislados de suelos, de rizósfera y de ambientes acuáticos. Incluso se han podido aislar a 10898 m de profundidad en sedimentos marinos (Pathom-aree *et al.*, 2006).

Se estima que en suelos las actinobacterias pueden comprender más del 30% de las poblaciones totales de microorganismos, siendo encontradas en el orden de 10^6 – 10^9 células/g de suelo (Kennedy, 1999; Janssen, 2006). Por lo general, se aíslan cepas de actinobacterias en la superficie del suelo y en profundidades de 2 a 15 cm; más allá de esta profundidad disminuye la cantidad de éstas (Franco Correa, 2008).

Una característica que presentan es la producción de un metabolito llamado geosmina, el cual genera el olor típico a suelo húmedo. La capacidad de producir enzimas extracelulares les permite desarrollarse como saprofitos, degradando celulosa, quitina, queratinas, almidón y varios compuestos recalcitrantes, contribuyendo al reciclado de los nutrientes en el suelo (McCarthy y Williams, 1992). Integrantes del género *Frankia* poseen la capacidad de vivir como simbioses de 25 géneros de plantas no leguminosas, llevando a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico. Dicha asociación es denominada simbiosis actinorrízica (Bautista y Valdés, 2008). La capacidad de promover el crecimiento vegetal indirectamente mediado por una amplia diversidad de actividades biológicas tales como antibacterianos, antifúngicos, insecticidas, o directamente a través de la producción de compuestos similares a las fitohormonas (Hamdali *et al.*, 2008) hace de este grupo de microorganismos un importante componente de los agroecosistemas.

3.2 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos que se reproducen de manera natural por esporas, sexual o asexualmente. Una de sus características es que tienen nutrición heterotrófica. La obtención de los nutrientes se realiza mediante degradación extracelular debido a la actividad de sus enzimas secretadas al medio, seguida por la absorción de los productos solubilizados (Webster y Weber, 2007). Muchos hongos son saprótrofos pudiendo utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono, aunque un considerable número de especies son parásitos de plantas, animales o de otros hongos (Carlile *et al.*, 2001).

La estructura fúngica consta de un complejo llamado talo constituido por una parte vegetativa, el micelio, compuesto por hifas y una parte reproductora. Las hifas son generalmente uniformes en los diferentes grupos taxonómicos de los hongos filamentosos. La característica diferencial se da por la presencia o ausencia de septos (Webster y Weber, 2007). Los hongos se reproducen por esporas, de origen asexual o sexual. En algunos grupos las esporas se forman sobre estructuras bien diferenciadas de las partes somáticas exhibiendo una gran variedad de formas y de mecanismos de ontogenia (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Como microorganismos del suelo, los hongos cumplen funciones esenciales en este sistema. La mayor parte de las especies fúngicas se distribuyen en los primeros centímetros del suelo y en la rizósfera de las plantas. Entre la micobiota edáfica se encuentran especies saprótrofas y simbiotes, la actividad de cada una de ellas tiene importantes consecuencias en el funcionamiento, estructura y equilibrio de los ecosistemas (Dighton, 2003).

El reino de los hongos se encuentra dividido en los *Phylum Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* y hongos mitospóricos (Mueller *et al.*, 2004; Carlile *et al.*, 2006). La clasificación de los hongos se basa principalmente en los caracteres derivados de las estructuras reproductivas (Alexopoulos *et al.*, 1996). Según Mayea *et al.* (1991) y Giri *et al.* (2005) los generos más comunes de hongos del suelo son *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Gliocladium*, *Monilia*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Pillularia*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorynchus*, *Pythium*, *Chaetomium* y *Rhizoctonia*.

4. Consideraciones finales

Con el aumento en la producción de bioetanol en Uruguay, la vinaza se ha convertido en un importante problema. Hoy en día existen en ALUR 5 piletas de 3 há. cada una, construidas con base y terraplenes de arcilla compactada, en donde se está almacenando la vinaza que se genera por la producción de bioetanol. Debido a la elevada carga en materia orgánica se torna inviable su vertido sin previo tratamiento a un curso de agua. Sin embargo, el poder “buffer” del suelo puede disminuir el potencial contaminante (Korndörfer *et al.*, 2004). Por otra parte, el contenido en minerales que la vinaza posee podría suplir varios requerimientos nutritivos de diferentes cultivos, por lo que la opción de usar la vinaza como fertilizante es una alternativa al tratamiento de la misma y, que a su vez, evita que se convierta en un contaminante ambiental.

Si se utilizara como fertilizante, la actividad microbiológica que existe en el suelo actuaría transformando la vinaza pero también ésta podría afectar a los microorganismos que se encuentran allí. El impacto podría ser negativo para el ecosistema ya que el funcionamiento del mismo está ampliamente gobernado por la dinámica de los microorganismos del suelo. En Uruguay no existen investigaciones al respecto, aunque si existe cierta información de otros países sobre cómo son los cambios que ocurren en los suelos en que se aplica vinaza, los valores máximos aplicables y su evolución a largo plazo. De todas formas, estos resultados no pueden ser trasladados automáticamente, debido a las características propias de los suelos de las diferentes regiones, siendo necesario el estudio de suelos específicos.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar los cambios en la microbiota del suelo tratado con vinaza.

2. Objetivos específicos

2.1. Determinar el efecto de la vinaza sobre la abundancia de bacterias heterótrofas, actinobacterias y hongos filamentosos.

2.2. Determinar el efecto de la vinaza sobre la diversidad de hongos filamentosos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sitios de muestreo

Los sitios en los que se realizaron los ensayos corresponden a predios de productores de caña de azúcar ubicados en las cercanías de ALUR, Bella Unión (coordenadas UTM: x- 324 a 332 Km. e y – 8642 a 8644 Km. Figura 1).



Figura 1. Mapa del Departamento de Artigas. Se representa con un punto rojo la Ciudad de Bella Unión.

Se utilizaron dos sitios con composición de suelo diferente. El sitio 1 está caracterizado como L1 (pradera parda), con una textura del horizonte A clasificada como franco arcillo arenoso y comprende un área de 1473 há (figura 2). El sitio 2 está caracterizado como B1 (litosoles, regosoles), con una textura del horizonte A clasificada como franco arcilloso y ocupa un área de 1093 há (figura 2).

Cada sitio fue dividido en cuatro parcelas de igual tamaño cada una, las cuales se trataron de la siguiente manera:

- aplicación de 450 m³/há de vinaza
- aplicación de 300 m³/há de vinaza
- aplicación de 150 m³/há de vinaza
- parcela control sin aplicación de vinaza



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

2. Obtención de muestras de suelo

Se realizaron dos eventos de muestreo para cada sitio: previo a la aplicación de vinaza y siembra de caña (15/02/2011 y 16/02/2011 para el sitio uno y dos respectivamente), y a los 33 o 50 días después de la aplicación de la misma para el sitio uno o dos respectivamente (06/04/2011 y 12/05/2011); ver tabla 1.

Para cada parcela se tomaron 3 muestras de suelo, compuestas de 10 tomas cada una, utilizando calador de 2 cm de diámetro a partir de los primeros 10 cm de la superficie. Los puntos de muestreo en cada parcela fueron elegidos con el programa random.org con el cual se generaron 8 sets con 30 números cada uno (del 1 al 250) a través de la función random/set generator/not ascending order. Dichos puntos se correlacionaron con una posición en la parcela de acuerdo a una grilla de 250 cuadrantes asignada previamente de acuerdo con el tamaño de cada parcela.

Las muestras fueron secadas al aire a 20° C, tamizadas mediante malla de 2 mm para su homogenización y conservadas a 4° C por un tiempo máximo de 2 meses en bolsas plásticas hasta su análisis.

Tabla 1 - Cronograma del ensayo. Se presentan los tiempos en que se realizaron los muestreos, la siembra y el tapado de la caña en cada parcela, respecto a la fecha de aplicación de vinaza

TRATAMIENTO m ³ /há	MUESTREO INICIAL (t ₀)	APLICACIÓN de VINAZA	SIEMBRA	TAPADO	MUESTREO FINAL
SITIO 1	días antes de la aplicación	fecha	días después de la aplicación de vinaza		
450	17	04/03/2011	17	28	33
300	17	04/03/2011	17	28	33
150	17	04/03/2011	17	18	33
0 (Control)	17	04/03/2011	17	18	33
SITIO 2	días antes de la aplicación	fecha	días después de la aplicación de vinaza		
450	35	23/03/2011	34	41	50
300	35	23/03/2011	34	41	50
150	35	23/03/2011	34	41	50
0 (Control)	35	23/03/2011	34	41	50

3. Análisis de las muestras

3.1. Humedad

En cada muestra se determinó el porcentaje de humedad pesando 10 g de suelo de cada una y dejándolos secar a 100 °C durante 48 h, de forma de poder expresar los resultados como UFC/g de suelo seco (Frioni, 2006).

3.2. Recuentos bacterianos

Para determinar el número de bacterias cultivables pertenecientes a diferentes grupos en cada muestra, se suspendieron 5 g de suelo en 45 ml de pirofosfato de sodio 0,1% (p/v) estéril y se agitaron a 150 rpm durante 30 minutos. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . El número de heterótrofos totales fue determinado mediante la siembra de 10 µl en gota por triplicado de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas de Petri con el medio Tryptic Soy Agar 1/10 Difco® (TSA 1/10) suplementado con cicloheximida 100 µg/ml (Smit *et al.*, 2001). Para el caso de las actinobacterias, se sembraron en superficie 100 µl de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} por duplicado en placas de Petri utilizando el medio Starch Casein Agar (SCA) suplementado con cicloheximida 100 µg/ml (Leoni y Ghini, 2003).

Las placas se incubaron a 25 °C y se contaron a las 48 h y 7 días las colonias de heterótrofos totales y a los 7 días las colonias típicas de actinobacterias. Las colonias

de actinobacterias se caracterizan por permanecer adheridas al medio de cultivo luego de pasar un algodón húmedo por la superficie del mismo.

3.3. Recuento de hongos filamentosos

Las parcelas en las cuales se analizaron los grupos de hongos filamentosos fueron la parcela control y las parcelas con aplicación de 150 y 450 m³/há de vinaza, para los dos sitios. De cada parcela se eligió una muestra al azar como representativa de la misma. De cada muestra se suspendieron 10g de suelo en 90 ml de agua estéril y se agitaron manualmente durante 5 minutos para su homogenización. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻³. De las diluciones 10⁻³ se sembraron en superficie 200-500 µl por quintuplicado en placas de Petri. El medio de cultivo utilizado fue Agar Malta (AM) al 2% suplementado con cloramfenicol 100 µg/ml y ajustando el pH a 4,5 con ácido láctico (Bettucci y Roquebert, 1995). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 72 h de manera de que se desarrollaran las colonias fúngicas y las mismas fueron contadas.

3.4. Obtención de aislamientos fúngicos

Para realizar el aislamiento, una vez desarrolladas las colonias fúngicas fueron numeradas sucesivamente. A las colonias que presentaron las mismas características macromorfológicas se les adjudicó el mismo número. Todas las colonias diferentes fueron aisladas de las placas de Petri utilizando ansa con punta y subcultivadas en tubos de agar inclinado con el medio AM de forma de obtener cultivos axénicos. Los tubos fueron dejados a temperatura ambiente hasta observar desarrollo fúngico. El aislamiento en tubos permitió la conservación de los mismos en cámara a 4 °C.

3.5. Identificación

Todos los aislamientos obtenidos en cultivos puros fueron repicados a placas de Petri de 5 cm conteniendo el medio AM e incubados a temperatura ambiente hasta observar el desarrollo de la colonia. Para la identificación del género y posible especie de los hongos obtenidos en cultivos puros, fue necesaria la utilización de bibliografía específica (Ellis, 1971; Schipper, 1977; van Oorschot, 1980; Klich, 2002). Para ello se tuvieron en cuenta las características de la colonia y la morfología microscópica de sus

estructuras somáticas y reproductivas. La observación de las características macroscópicas permitió en muchos casos determinar el género del aislamiento. Para la observación de las características morfológicas microscópicas se realizaron preparados en portaobjetos ya sea por la técnica de cinta pegante o montaje por disección. Como agente de tinción se utilizó lactofenol azul de algodón. Las muestras fueron observadas en microscopio óptico con un aumento de 40X.

Todos los aislamientos a excepción de los géneros *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* fueron identificados a nivel de especie de la forma mencionada anteriormente. Las especies de estos últimos fueron identificados como se describe a continuación:

3.5.1. *Penicillium* spp. y *Eupenicillium* spp.

Se utilizó la metodología propuesta por Pitt (1979). La misma consiste en utilizar comparativamente tres medios de cultivo: Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA) y Glicerol 25% Nitrate Agar (G25N). Cada cepa fue sembrada por triplicado por placa utilizando ansa en punta. Se sembraron tres placas de CYA incubadas a 5 °C, 25 °C y 37 °C, una placa de MEA incubada a 25 °C y una placa de G25N incubada a 25° C. El tiempo de incubación para todos los medios fue de 7 días. Para la identificación de las cepas a nivel de especie se siguieron las claves elaboradas por Pitt (1979), teniendo en cuenta el diámetro de las colonias, sus características morfológicas macro y microscópicas y la producción de pigmentos difusibles en el medio de cultivo.

3.5.2. *Fusarium* spp.

La identificación de las especies correspondientes a este género consistió en sembrar cada aislamiento en dos medios de cultivo diferentes, Potato Dextrose Agar (PDA) y Agar Clavel. El medio PDA se utilizó para observar las características macromorfológicas de cada aislamiento mientras que el medio Agar Clavel permitió determinar las características microscópicas del mismo. A partir de los datos conjuntos obtenidos para cada medio y mediante el uso de claves taxonómicas se identificó la especie de todos los aislamientos (Burgess *et al.*, 1994).

3.5.3. *Trichoderma* spp.

Los aislamientos de este género fueron agrupados por morfotipos según las características de crecimiento de las colonias sembradas en AM. Las especies no fueron identificadas.

4. Análisis de datos

4.1. Recuentos microbianos

Los datos obtenidos de los recuentos fueron convertidos por el factor de corrección de la humedad de cada muestra para poder expresarse como unidades formadoras de colonias (UFC)/g suelo seco (Frioni, 2006). Estos valores fueron transformados a $\log_{10}$ y analizados utilizando el programa Statistica 5.0. Se examinó la normalidad de los datos por el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett. En los casos donde la distribución de los datos fue normal y las varianzas homogéneas, se evaluaron para cada variable (abundancia de los grupos de bacterias, abundancia de hongos filamentosos y porcentaje de actinobacterias respecto a heterótrofos) las diferencias entre los tratamientos mediante ANOVA de una vía (con tratamiento o tiempo como factor) y el test de Tukey's HSD (Honestly Significant Difference). De lo contrario, se realizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Mann-Whitney. Los análisis se realizaron de forma independiente para cada sitio teniendo en cuenta las diferencias entre los tratamientos a un tiempo dado, como también las diferencias entre el tiempo de muestreo para cada tratamiento.

4.2. Comunidad de hongos filamentosos

4.2.1. Densidad relativa

Se calculó la densidad relativa de cada especie presente en cada suelo como el (núm. de aislamientos de la especie / núm. total de aislamientos) x 100.

4.2.2. Análisis de correspondencia

Para el ordenamiento de las especies en cada tipo de suelo con respecto a los tratamientos se realizó un análisis de correspondencia utilizando el programa Past (Hammer *et al.*, 2001). En este se obtienen los tratamientos ordenados en un espacio determinado por dos ejes que resumen el efecto de las variables. El análisis fue realizado en base a la densidad relativa de cada especie.

4.2.3. Porcentaje de mínima similitud

De forma de comparar la estructura de las comunidades de hongos filamentosos entre los distintos tratamientos y en el tiempo se determinó el porcentaje de mínima similitud (Krebs, 1989). Este índice fue calculado como:

$P = \sum \text{del \% mínimo } (P_{1i}, P_{2i})$ siendo P , el porcentaje mínimo de similitud entre las muestras 1 y 2; P_{1i} , el % de las especies i en la comunidad de la muestra 1 y P_{2i} , el porcentaje de las especies i en la comunidad de la muestra 2.

RESULTADOS

1. Abundancia de bacterias cultivables en suelos con diferentes dosis de vinaza aplicada

Se analizaron las poblaciones de bacterias heterótrofas totales y actinobacterias mediante recuento en placa en dos sitios con distinto tipo de suelo, previo y posterior a la aplicación de diferentes dosis de vinaza (figura 3).

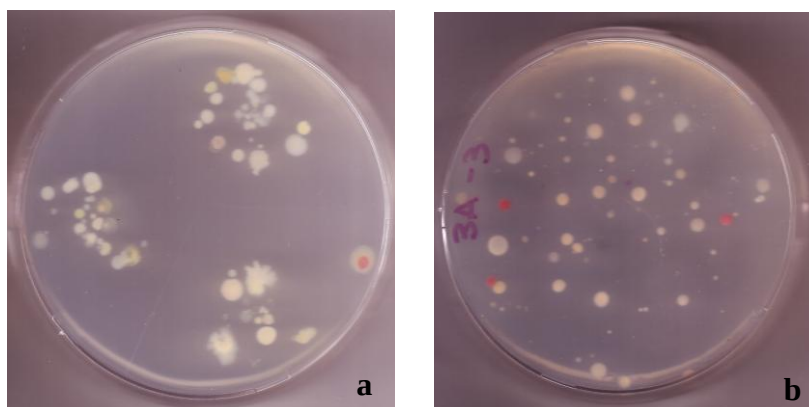


Figura 3. Fotografías de placas con colonias de **(a)** bacterias heterótrofas y **(b)** actinobacterias.

Sitio 1. El número de heterótrofos totales antes de la aplicación de vinaza se ubicó en el orden de 10^7 - 10^8 UFC/g suelo seco, sin manifestar diferencias estadísticamente significativas entre las parcelas. Luego de 33 días de la aplicación de vinaza no se observaron diferencias significativas en los diferentes tratamientos respecto al control aunque se detectó un aumento significativo en el tiempo en la parcela tratada con $300 \text{ m}^3/\text{há}$ (tabla 2, figura 4).

Tabla 2. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo del sitio 1

TRATAMIENTO	Heterótrofos (UFC/g suelo seco)	
	Tiempo 0 días	Tiempo 33 días
Vinaza ($450 \text{ m}^3/\text{há}$)	$1,42 \times 10^8$ a	$1,26 \times 10^8$ a
Vinaza ($300 \text{ m}^3/\text{há}$)	$1,37 \times 10^7$ a	$1,32 \times 10^8$ a *
Vinaza ($150 \text{ m}^3/\text{há}$)	$2,72 \times 10^7$ a	$2,17 \times 10^7$ b
Control sin vinaza	$3,49 \times 10^7$ a	$4,21 \times 10^7$ ab

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos del mismo muestreo ($p < 0,05$); * representa diferencias significativas en el tiempo para cada tratamiento ($p < 0,05$).

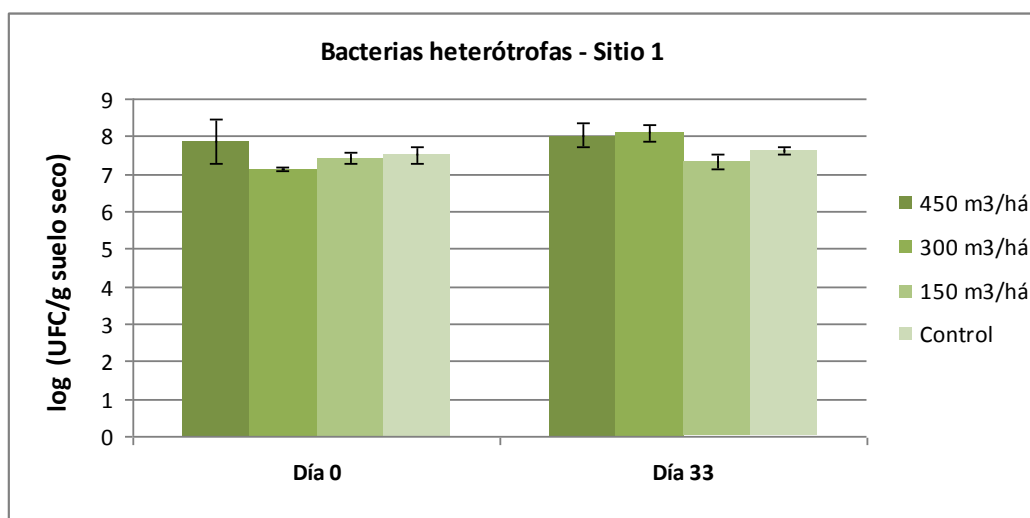


Figura 4. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo del sitio 1 previo a los tratamientos con vinaza (Día 0) y 33 días posterior a la aplicación de vinaza (Día 33). Los valores están expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco y corresponden a la media de 3 repeticiones; las barras indican la desviación estándar. 450 m³/há, 300 m³/há y 150 m³/há: corresponde a la cantidad de vinaza aplicada. Control: parcela sin aplicación de vinaza.

La población de actinobacterias presentó al inicio del ensayo diferencias entre las parcelas exponiendo valores del orden de 10^5 - 10^6 UFC/g suelo seco. En este grupo de bacterias, luego de la aplicación de vinaza se detectó un aumento significativo en los tratamientos de 300 y 450 m³/há respecto al control, observándose un importante efecto en el tratamiento de 300 m³/há. En este último el número de actinobacterias se incrementó en un orden de magnitud entre los tiempos de muestreo considerados (tabla 3, figura 5).

Tabla 3. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo del sitio 1

TRATAMIENTO	Actinobacterias (UFC/g suelo seco)	
	Tiempo 0 días	Tiempo 33 días
Vinaza (450m³/há)	$4,17 \times 10^6$ a	$8,43 \times 10^6$ a
Vinaza (300m³/há)	$8,89 \times 10^5$ b	$8,87 \times 10^6$ a*
Vinaza (150m³/há)	$2,94 \times 10^6$ a	$5,11 \times 10^6$ b
Control sin vinaza	$3,81 \times 10^6$ a	$4,67 \times 10^6$ b

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos del mismo muestreo ($p < 0,05$); * representa diferencias significativas en el tiempo para cada tratamiento ($p < 0,05$).

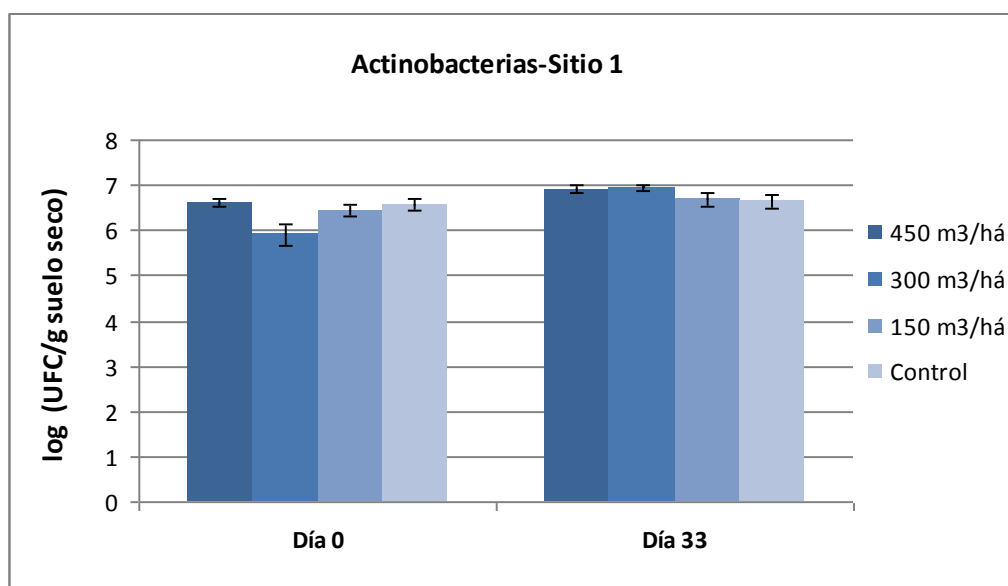


Figura 5. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo del sitio 1 previo a los tratamientos con vinaza (Día 0) y 33 días posterior a la aplicación de vinaza (Día 33). Los valores están expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco y corresponden a la media de 3 repeticiones; las barras indican la desviación estándar. 450 m³/há, 300 m³/há y 150 m³/há: corresponde a la cantidad de vinaza aplicada. Control: parcela sin aplicación de vinaza.

Se determinó la representación de la población de actinobacterias sobre la de heterótrofos totales las cuales constituyeron entre un 6-12 % previo a la aplicación de vinaza. En las muestras tomadas a los 33 días de la aplicación de vinaza el porcentaje de actinobacterias en el tratamiento de 150 m³/há se duplicó en el tiempo, observándose un aumento significativo respecto al control. No se observaron diferencias en los otros tratamientos respecto al control (tabla 4, figura 6).

Tabla 4. Porcentaje de actinobacterias respecto a heterótrofos totales en muestras de suelo del sitio 1

TRATAMIENTO	% Actinobacterias respecto a heterótrofos totales	
	Tiempo 0 días	Tiempo 33 días
Vinaza (450m ³ /há)	9,49 a	8,92 b
Vinaza (300m ³ /há)	6,45 a	7,37 b
Vinaza (150m ³ /há)	12,7 a	24,05 a
Control sin vinaza	12,6 a	11,11 b

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos del mismo muestreo ($p < 0,05$).

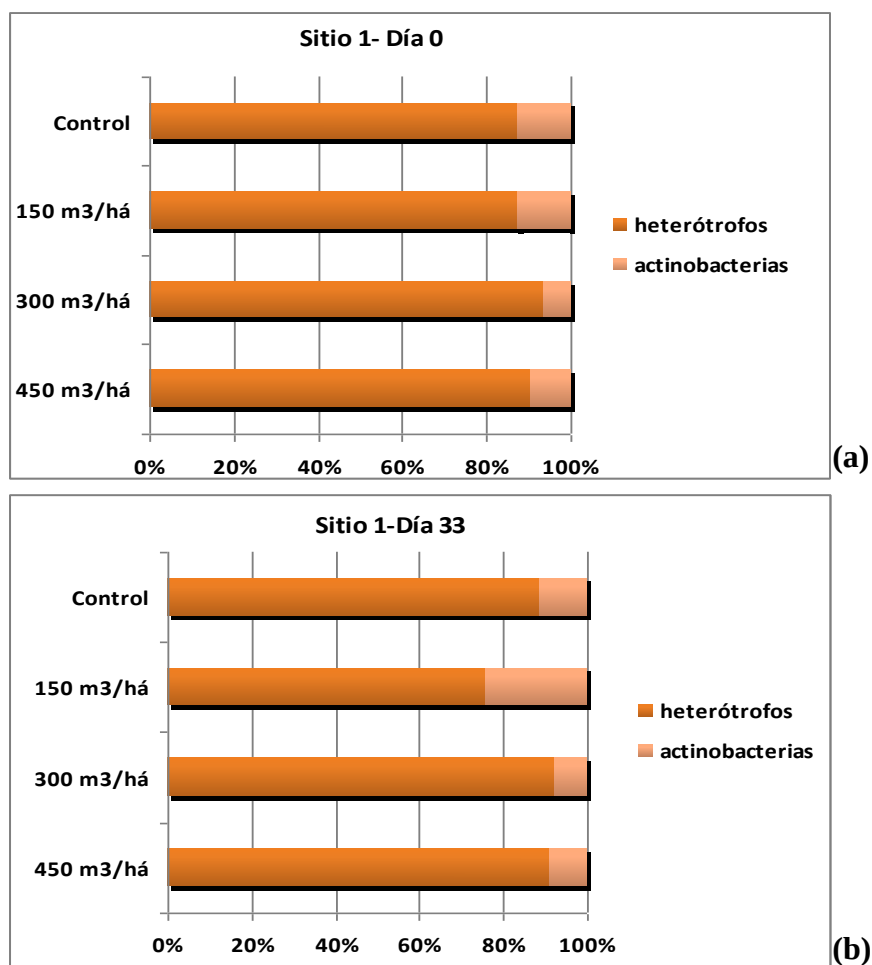


Figura 6. Porcentaje de actinobacterias respecto a heterótrofos totales en muestras de suelo del sitio 1 **(a)** previo a los tratamientos con vinaza y **(b)** 33 días posteriores a la aplicación de vinaza. Valores medios de 3 repeticiones calculados en base a las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco. 450 m³/há, 300 m³/há y 150 m³/há: corresponde a la cantidad de vinaza aplicada. Control: parcela sin aplicación de vinaza.

Sitio 2. Se encontró una alta homogeneidad en cuanto a la abundancia de las poblaciones de heterótrofos totales y actinobacterias en todas las parcelas analizadas previo a la aplicación de vinaza. Dichas poblaciones presentaron valores de 10^7 y 10^6 UFC/g suelo seco respectivamente. En ninguno de los dos casos se vieron efectos luego de los 50 días del tratamiento con vinaza (tablas 5 y 6, figuras 7 y 8). El tratamiento con $450 \text{ m}^3/\text{há}$ presentó un aumento en el tiempo para las actinobacterias pero de todas formas no fue significativo con respecto al control.

Tabla 5. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo del sitio 2

TRATAMIENTO	Heterótrofos (UFC/g suelo seco)	
	Tiempo 0 días	Tiempo 50 días
Vinaza ($450 \text{ m}^3/\text{há}$)	$4,17 \times 10^7$ a	$5,65 \times 10^7$ a
Vinaza ($300 \text{ m}^3/\text{há}$)	$3,30 \times 10^7$ a	$7,37 \times 10^7$ a
Vinaza ($150 \text{ m}^3/\text{há}$)	$6,05 \times 10^7$ a	$7,26 \times 10^7$ a
Control sin vinaza	$3,28 \times 10^7$ a	$1,10 \times 10^8$ a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos del mismo muestreo ($p < 0,05$).

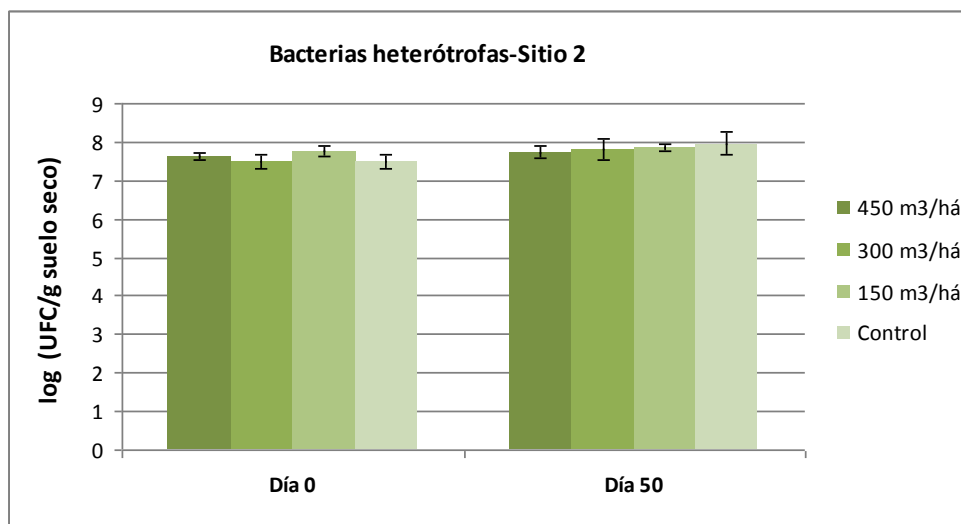


Figura 7. Abundancia de bacterias heterótrofas en muestras de suelo del sitio 2 previo a los tratamientos con vinaza (Día 0) y 50 días posterior a la aplicación de vinaza (Día 50). Los valores están expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco y corresponden a la media de 3 repeticiones; las barras indican la desviación estándar. $450 \text{ m}^3/\text{há}$, $300 \text{ m}^3/\text{há}$ y $150 \text{ m}^3/\text{há}$: corresponde a la cantidad de vinaza aplicada. Control: parcela sin aplicación de vinaza.

Tabla 6. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo del sitio 2

TRATAMIENTO	Actinobacterias (UFC/g suelo seco)	
	Tiempo 0 días	Tiempo 50 días
Vinaza (450m ³ /há)	4,62 x 10 ⁶ a	7,11 x 10 ⁶ a *
Vinaza (300m ³ /há)	5,01 x 10 ⁶ a	7,02 x 10 ⁶ a
Vinaza (150m ³ /há)	7,16 x 10 ⁶ a	1,13 x 10 ⁷ a
Control sin vinaza	5,52 x 10 ⁶ a	1,01 x 10 ⁷ a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos del mismo muestreo ($p < 0,05$); * representa diferencias significativas en el tiempo para cada tratamiento ($p < 0,05$).

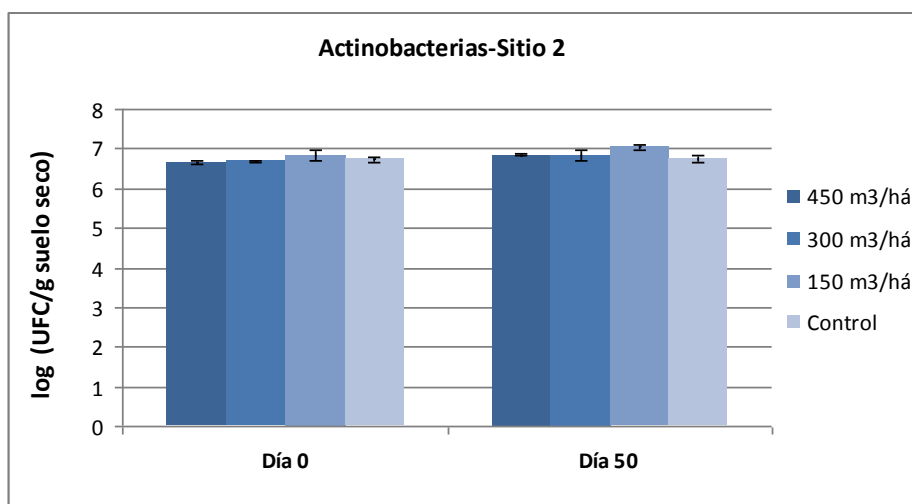


Figura 8. Abundancia de actinobacterias en muestras de suelo del sitio 2 previo a los tratamientos con vinaza (Día 0) y 50 días posterior a la aplicación de vinaza (Día 50). Los valores están expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco y corresponden a la media de 3 repeticiones; las barras indican la desviación estándar. 450 m³/há, 300 m³/há y 150 m³/há: corresponde a la cantidad de vinaza aplicada. Control: parcela sin aplicación de vinaza.

El porcentaje de actinobacterias respecto a la composición de heterótrofos totales se ubicó entre 11 y 18 % sin exponer cambios luego de los tratamientos con vinaza (tabla 7, figura 9).

Tabla 7. Porcentaje de actinobacterias respecto a heterótrofos totales en muestras de suelo del sitio 2

TRATAMIENTO	% Actinobacterias respecto Heterótrofos totales	
	Tiempo 0 días	Tiempo 50 días
Vinaza (450m ³ /há)	11,48 a	13,44 a
Vinaza (300m ³ /há)	17,17 a	13,25 a
Vinaza (150m ³ /há)	11,92 a	15,64 a
Control sin vinaza	18,32 a	11,38 a

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos del mismo muestreo ($p < 0,05$); * representa diferencias significativas en el tiempo para cada tratamiento ($p < 0,05$)

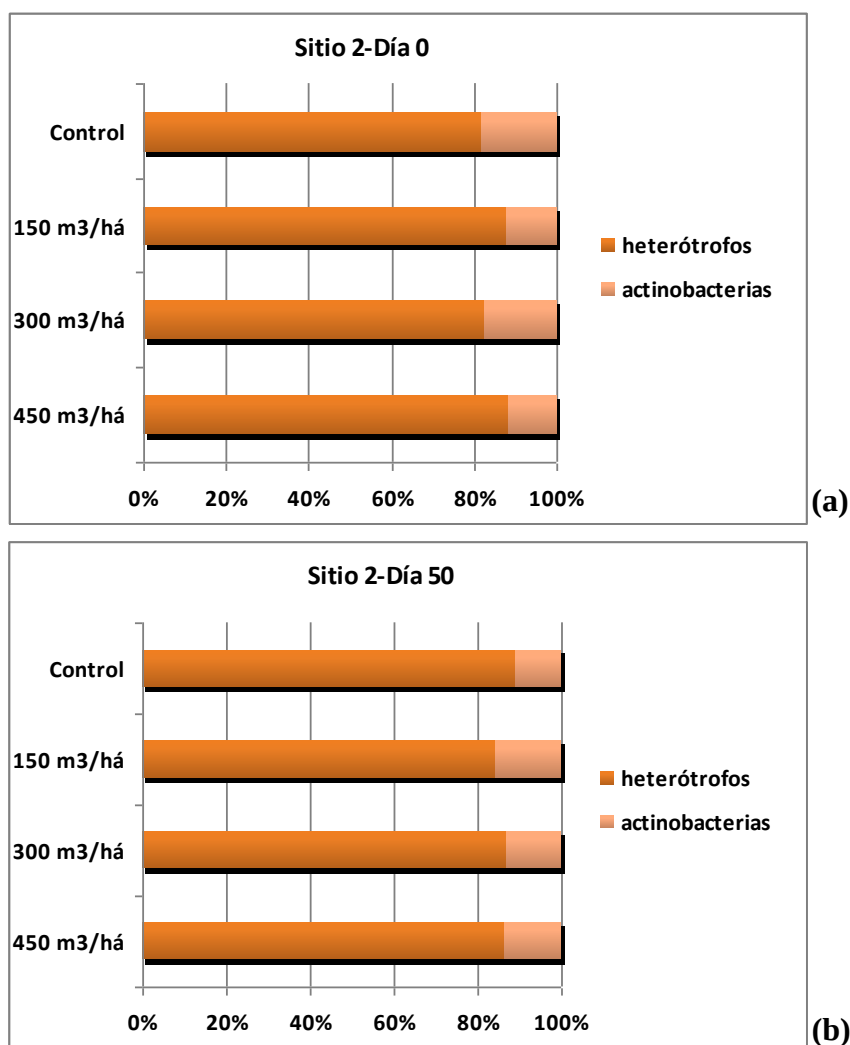


Figura 9. Porcentaje de actinobacterias respecto a heterótrofos totales en muestras de suelo del sitio 2 **(a)** previo a los tratamientos con vinaza y **(b)** 50 días posteriores a la aplicación de vinaza. Valores medios de 3 repeticiones calculados en base a las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco. 450 m³/há, 300 m³/há y 150 m³/há: corresponde a la cantidad de vinaza aplicada. Control: parcela sin aplicación de vinaza.

2. Abundancia de hongos filamentosos

Se analizaron los hongos filamentosos en las parcelas control y con aplicación de 450 m³/ha de vinaza, para los dos sitios y los dos tiempos de muestreo. En algunos casos se analizó una de las parcelas con dosis de vinaza intermedia.

Sitio 1. Previo al tratamiento con vinaza, no se observaron diferencias entre las parcelas analizadas en cuanto al número de hongos filamentosos (tabla 8, figura 10a). Los valores de abundancia determinados se ubicaron en el orden de 10⁵ UFC/g de suelo seco. Luego del tratamiento con vinaza, la parcela a la cual se le aplicó 450 m³/há de vinaza presentó un aumento al doble con respecto al control. Además se pudo observar un aumento en el tiempo en ambas parcelas. El tratamiento con 150 m³/há mostró un valor significativamente menor respecto a la parcela control (tabla 8, figura 10b).

Tabla 8. Abundancia de hongos filamentosos en muestras de suelo del sitio 1

TRATAMIENTO	Hongos filamentosos (UFC/g suelo seco)	
	Tiempo 0 días	Tiempo 33 días
Vinaza (450m ³ /há)	1,34 x 10 ⁵ a	4,89 x 10 ⁵ a *
Vinaza (300m ³ /há)	1,19 x 10 ⁵ a	N/D
Vinaza (150m ³ /há)	N/D	2,18 x 10 ⁵ c
Control sin vinaza	1,40 x 10 ⁵ a	2,96 x 10 ⁵ b *

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos del mismo muestreo (p<0,05); * representa diferencias significativas en el tiempo para cada tratamiento (p<0,05). N/D No determinar.

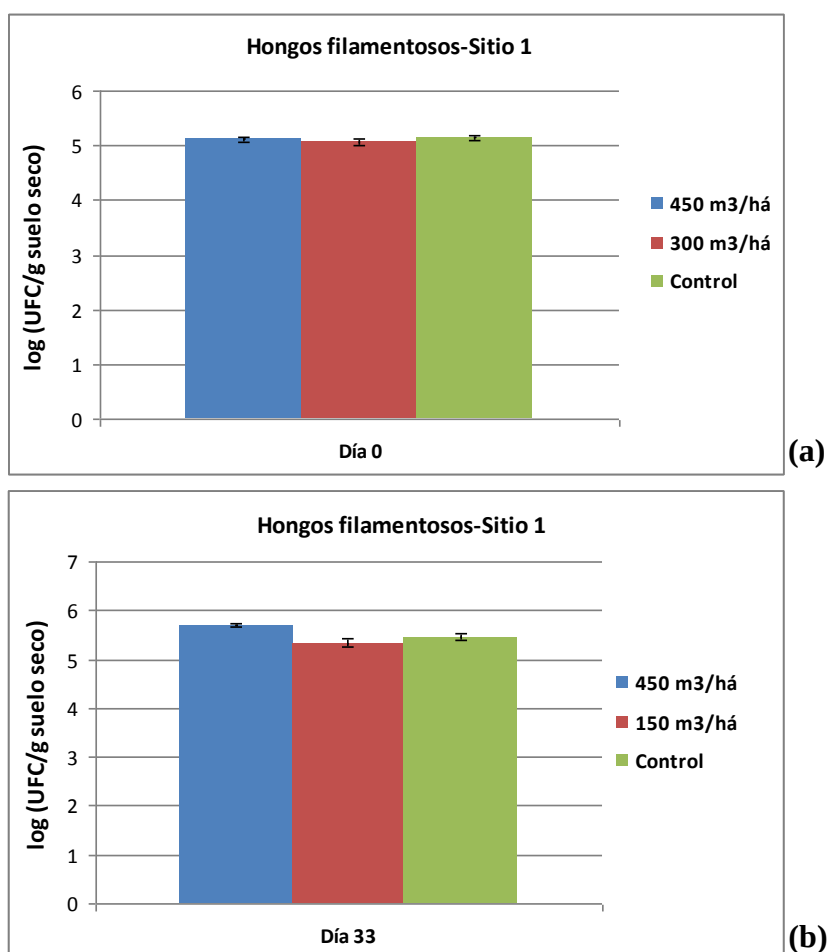


Figura 10. Abundancia de hongos filamentosos en muestras de suelo del sitio 1 **(a)** previo a los tratamientos con vinaza y **(b)** 33 días posterior a la aplicación de vinaza. Los valores están expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco y corresponden a la media de 5 repeticiones; las barras indican la desviación estándar. 450 m³/há, 300 m³/há y 150 m³/há: corresponde a la cantidad de vinaza aplicada. Control: parcela sin aplicación de vinaza.

Sitio 2. No se encontraron diferencias entre las parcelas previo a la aplicación de vinaza (tabla 9, figura 11a), presentando valores de abundancia del orden de 10^4 UFC/g suelo seco. Luego de los 50 días se encontró un mayor número de hongos filamentosos en el tratamiento con 150 m³/há respecto al control, pero un menor número en el tratamiento de 450 m³/há respecto al control (tabla 9, figura 11b). Tanto en el tratamiento de 450 m³/há como en el control la variación en el tiempo fue significativa.

Tabla 9. Abundancia de hongos filamentosos en muestras de suelo del sitio 2

TRATAMIENTO	Hongos filamentosos (UFC/g suelo seco)	
	Tiempo 0 días	Tiempo 50 días
Vinaza (450m ³ /há)	5,83 x 10 ⁴ a	1,44 x 10 ⁵ c*
Vinaza (300m ³ /há)	8,59 x 10 ⁴ a	N/D
Vinaza (150m ³ /há)	N/D	3,86 x 10 ⁵ a
Control sin vinaza	6,97 x 10 ⁴ a	2,81 x 10 ⁵ b*

Valores medios de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos del mismo muestreo ($p < 0,05$); * representa diferencias significativas en el tiempo para cada tratamiento ($p < 0,05$). N/D no determinado.

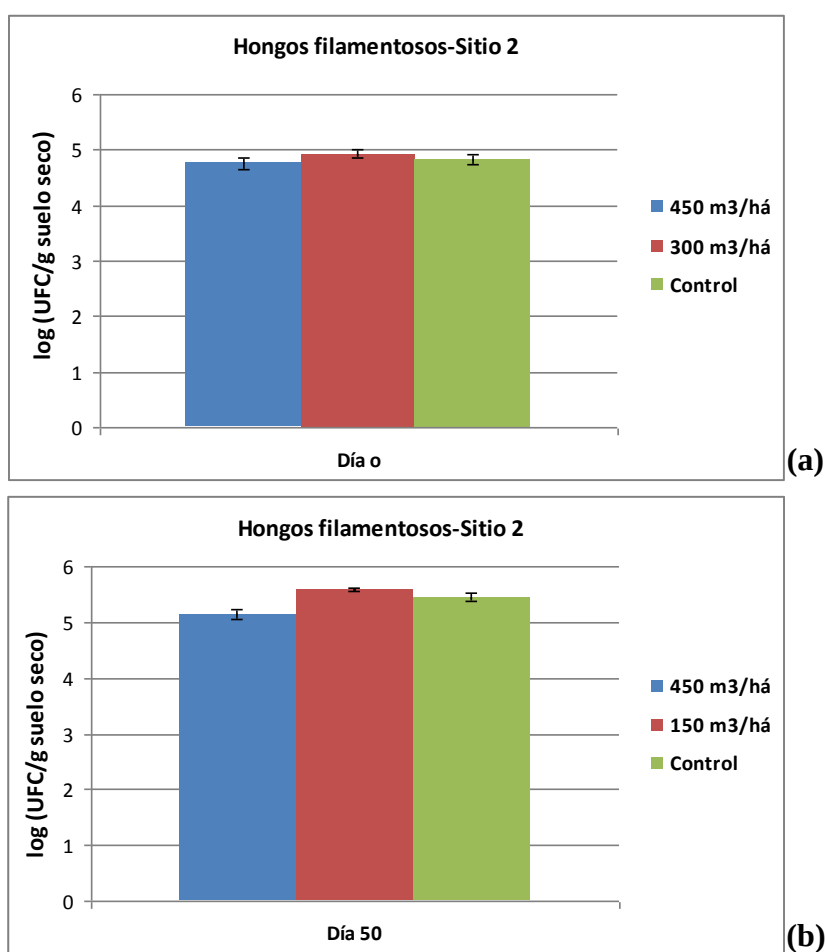


Figura 11. Abundancia de hongos filamentosos en muestras de suelo del sitio 1 **(a)** previo a los tratamientos con vinaza y **(b)** 50 días posterior a la aplicación de vinaza. Los valores están expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco y corresponden a la media de 5 repeticiones; las barras indican la desviación estándar. 450 m³/há, 300 m³/há y 150 m³/há: corresponde a la cantidad de vinaza aplicada. Control: parcela sin aplicación de vinaza.

3. Identificación de hongos filamentosos

La composición y organización de las comunidades fúngicas fue estimada en los dos sitios previo y posterior a la aplicación de diferentes dosis de vinaza. A partir de las muestras tomadas se obtuvo un total de 968 aislamientos pertenecientes a 46 taxa. Todas las taxa representadas por lo menos en uno de los dos sitios se muestran en las tablas 10 y 11 con densidades relativas entre 0,39 y 51,11 %.

Sitio 1. A partir de las muestras tomadas se obtuvo un total de 555 aislamientos pertenecientes a 31 taxa. Del total de taxa obtenidos solo 15 componían la comunidad inicial del sitio, previo a la aplicación de vinaza (tiempo 0). En ese momento las especies dominantes pertenecían al *Phylum Zygomycota* siendo *Zygorhynchus moelleri* el que presentó una mayor densidad relativa correspondiente al 21,02 %. Seguido de este se encontró *Mortierella ramaniana* con 15,06 %. *Aureobasidium sp.* y *Penicillium sp.1* fueron los menos representados con 0,95 % (tabla 10, figuras 12-14).

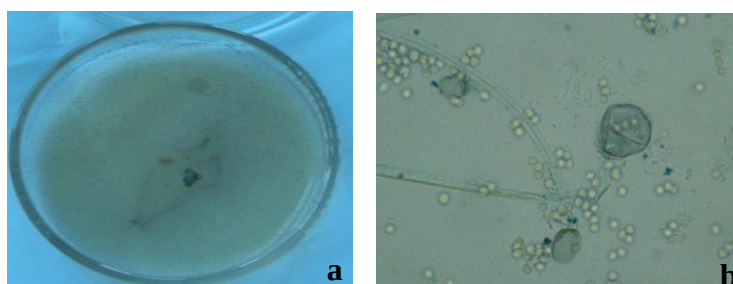


Figura 12. Aspecto de la colonia (a) y micrografía (b) de *Zygorhynchus moelleri*.

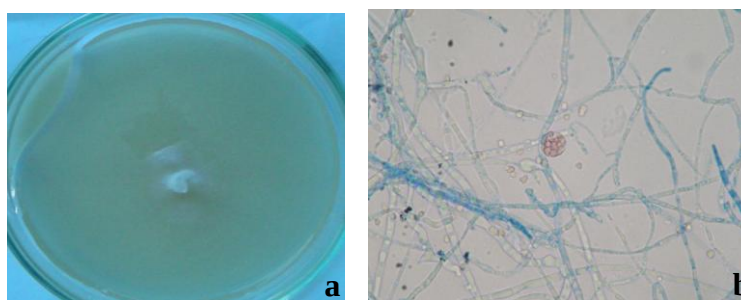


Figura 13. Aspecto de la colonia (a) y micrografía (b) de *Mortierella ramaniana*.

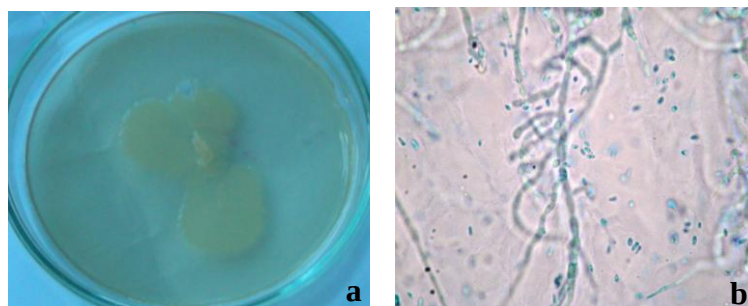


Figura 14. Aspecto de la colonia **(a)** y micrografía **(b)** de *Aureobasidium* sp.

Luego de la aplicación de vinaza, de la parcela tratada con 450 m³/há se obtuvieron 256 aislamientos pertenecientes a 13 taxa. La dominancia estuvo dada por *Paecilomyces* sp. con una abundancia relativa del 46,87 % seguida por *Eupenicillium brefeldianum* con 14,84 %. *Rhizopus stolonifer* y *Trichoderma* sp.12 fueron los menos encontrados representando el 0,39 % de los aislamientos cada uno (tabla 10, figuras 15-18). En la parcela tratada con 150 m³/há se obtuvo un total de 120 aislamientos pertenecientes a 15 taxa. En este caso, al igual que con el mayor tratamiento, la dominancia estuvo dada por *Paecilomyces* sp. con una abundancia de 37,5 %. La menor densidad correspondió a *Rhizopus stolonifer*, *Chaetomium* sp., *Trichoderma* sp.9, *Trichoderma* sp.11 con 0,83 % (tabla 10, figuras 15, 17 y 18). De la parcela control se obtuvieron 129 aislamientos pertenecientes a 13 taxa de los cuales *Mortierella ramaniana* y *Paecilomyces* sp fueron los dominantes con 32,55 y 23,25 % respectivamente. En tanto que *Zygorhynchus moelleri*, *Aspergillus terreus* y *Eupenicillium javanicum* resultaron los representantes menores con 0,77 % (tabla 10, figuras 15-17 y 19).

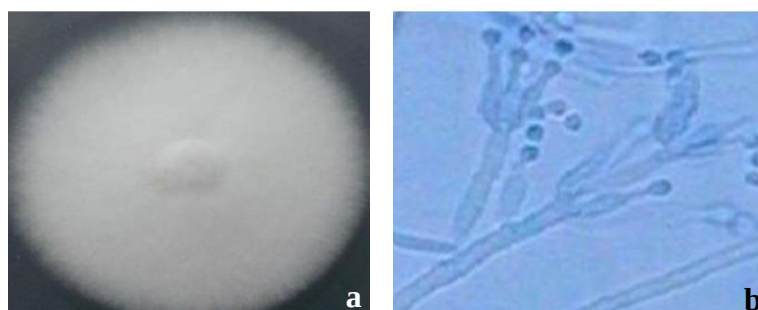


Figura 15. Aspecto de la colonia **(a)** y micrografía **(b)** de *Paecilomyces* sp.

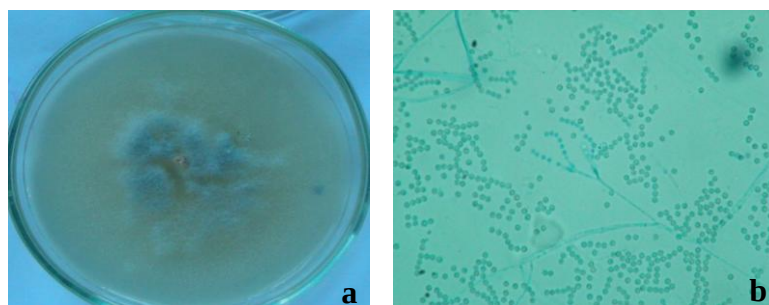


Figura 16. Aspecto de la colonia **(a)** y micrografía **(b)** de *Eupenicillium* sp.

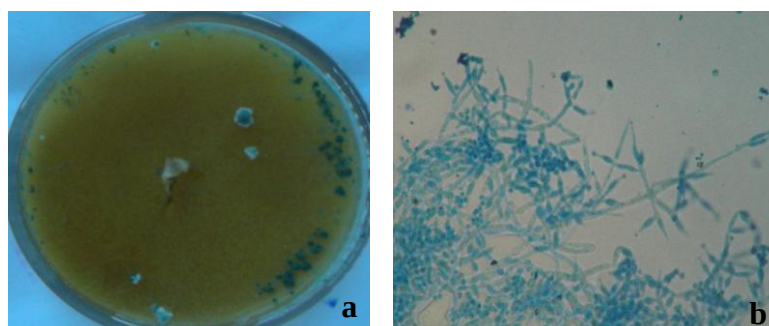


Figura 17. Aspecto de la colonia **(a)** y micrografía **(b)** de *Trichoderma* sp.

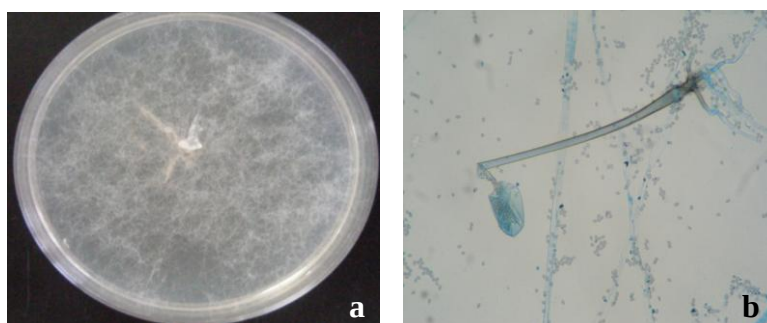


Figura 18. Aspecto de la colonia **(a)** y micrografía **(b)** de *Rhizopus stolonifer*.

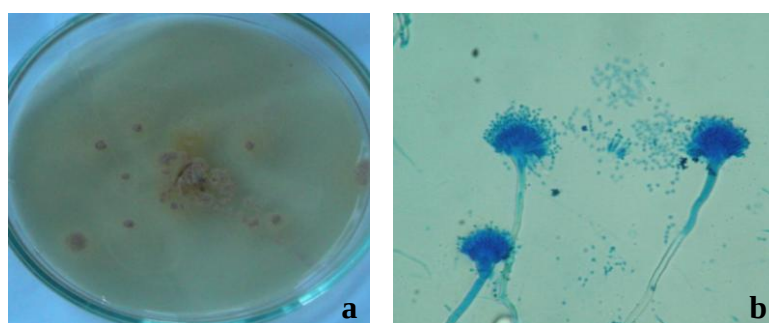


Figura 19. Aspecto de la colonia **(a)** y micrografía **(b)** de *Aspergillus terreus*

Tabla 10. Densidad relativa de los aislamientos de hongos filamentosos en muestras de suelo del sitio 1

Aislamientos	Tiempo 0 día	Tiempo 33 días		
	Promedio del sitio	Vinaza 450m ³ /há	Vinaza 150m ³ /há	Parcela control
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	-	7,42	4,16	0,77
<i>Aureobasidium</i> sp.	0,95	-	-	-
<i>Chaetomium</i> sp.	-	-	0,83	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	3,33	-
<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner	0,6	-	-	-
<i>Eupenicillium abidjanum</i> Stolk	-	-	1,66	6,97
<i>Eupenicillium brefeldianum</i> (Dodge) Stolk & Scott	-	14,84	10	-
<i>Eupenicillium javanicum</i> (van Beyma) Stolk & Scott	-	-	-	0,77
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	1,9	2,73	2,5	2,32
<i>Fusarium nygamai</i> Burgess & Trimboli	8,48	-	7,5	2,32
<i>Mortierella ramaniana</i> Martseniuk & Mazilkin	15,06	4,68	12,5	32,55
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	-	-	-	3,1
<i>Mucor racemosus</i> Zycha	1,21	-	-	-
<i>Mucor circinelloides</i> Schipper	3,71	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	46,87	37,5	23,25
<i>Penicillium</i> sp. 1	0,95	-	-	-
<i>Penicillium minioluteum</i> Dierckx	1,21	-	-	-
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenberg: Fries) Vuillemin	-	0,39	0,83	10,07
<i>Tielavia terricola</i> (Gilman & Abbott) Emmons	1,9	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	9,13	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.1 (24)	14,12	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.2 (28)	2,25	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.3	-	1,95	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.8	-	2,34	1,66	1,55
<i>Trichoderma</i> sp.9	-	0,39	0,83	-
<i>Trichoderma</i> sp.10	-	0,78	-	1,55
<i>Trichoderma</i> sp.11	-	0,78	0,83	-
<i>Trichoderma</i> sp.12	14,42	3,9	10	13,95
<i>Trichosporium</i> sp.	-	12,89	-	-
<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuillemin	21,02	-	4,16	0,77
Micelio hialino esteril	2,98	-	1,66	-
Total de aislamientos	50	256	120	129
Total de taxa	15	13	15	13

Sitio 2. De un total de 413 aislamientos se obtuvieron 32 taxa en este sitio. La comunidad al inicio del ensayo estaba compuesta por 20 taxa identificadas a partir de 61 aislamientos. En ésta *Aspergillus fumigatus* fue dominante con una abundancia relativa del 29,64 %. La especie menos representada fue *Penicillium mirabile* con una densidad relativa de 0,43 % (tabla 11, figuras 20 y 21).

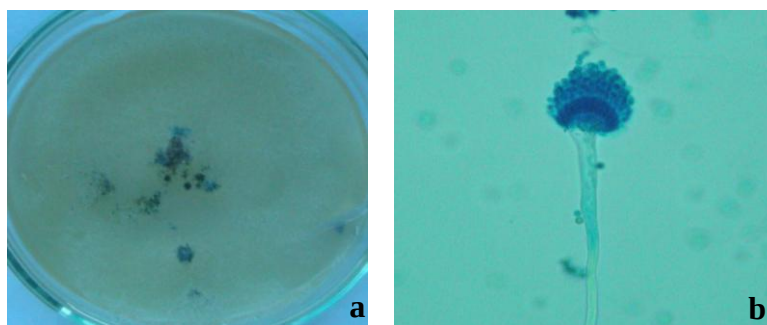


Figura 20. Aspecto de la colonia (a) y micrografía (b) de *Aspergillus fumigatus*.

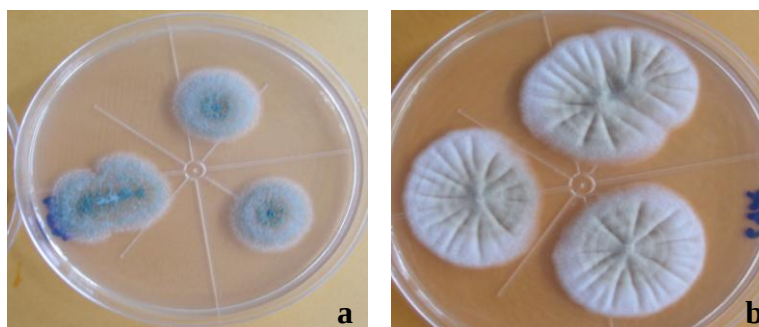


Figura 21. Aspecto de las colonias en diferentes medios de cultivo de *Penicillium mirabile*.

Luego de la aplicación de vinaza, de la parcela tratada con 450 m³/há se pudieron obtener 14 taxa en 60 aislamientos. En este caso la comunidad estaba dominada por *Cladosporium* sp. con una densidad relativa de 26,66 %. Varias especies presentaron la menor densidad relativa dentro de las cuales se puede mencionar a *Alternaria alternata* con 1,66 % (tabla 11, figuras 22 y 23). El tratamiento con 150 m³/há de vinaza presentó 6 taxa en un total de 180 aislamientos. En este caso se vio una amplia dominancia de *Alternaria alternata* con el 51,11 % de densidad relativa seguida por *Eupenicillium brefeldianum* con el 25 %. *Fusarium oxysporum* fue el menor representante con una densidad del 1,11 %. La parcela control presentó 10 taxa de un

total de 112 aislamientos, siendo dominante al igual que en el caso anterior *Alternaria alternata* con 44,64 % (tabla 11, figuras 16, 22 y 24).

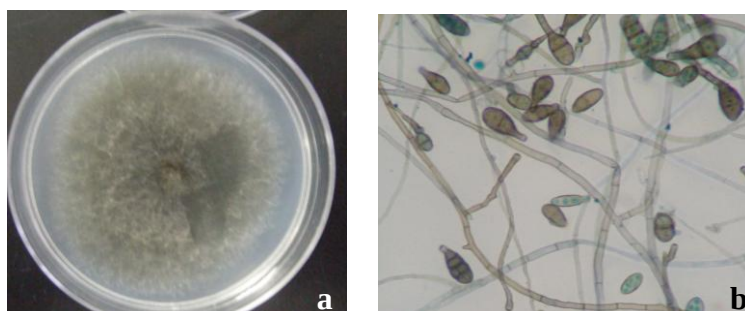


Figura 22. Aspecto de la colonia **(a)** y micrografía **(b)** de *Alternaria alternata*.

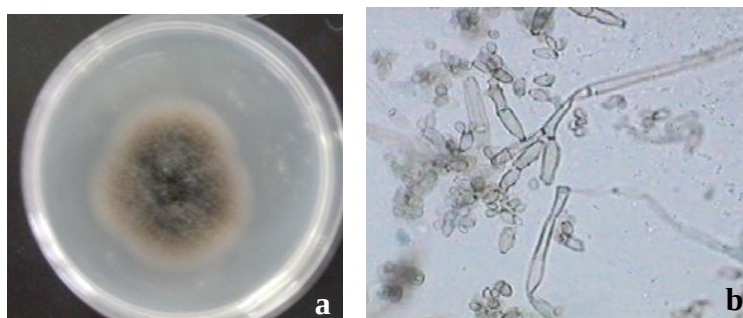


Figura 23. Aspecto de la colonia **(a)** y micrografía **(b)** de *Cladosporium* sp.

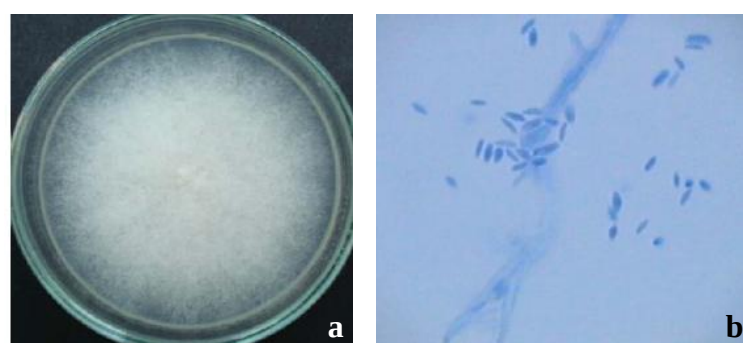


Figura 24. Aspecto de la colonia **(a)** y micrografía **(b)** de *Fusarium oxysporum*.

Tabla 11. Densidad relativa de los aislamientos de hongos filamentosos en muestras de suelo del sitio 2

Aislamientos	Tiempo 0 día	Tiempo 50 días		
	Promedio del sitio	Vinaza 450m ³ /há	Vinaza 150m ³ /há	Parcela control
<i>Alternaria alternata</i> Fries: Fries von Keissler	-	1,66	51,11	44,64
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres.	29,64	10	-	-
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	5,36	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	26,66	-	-
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedjin	8,87	-	-	-
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb.	4,16	-	-	-
<i>Eupenicillium brefeldianum</i> (Dodge) Stolk & Scott	1,75	1,66	25	2,67
<i>Eupenicillium erubescens</i> Scott	0,65	-	-	-
<i>Eupenicillium javanicum</i> (van Beyma) Stolk & Scott	0,87	-	-	8,03
<i>Exophiala</i> sp.	1,3	-	-	-
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc	-	11,66	-	1,78
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	-	1,66	5	-
<i>Fusarium nygamai</i> Burgess & Trimboli	0,65	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht emend Snyder & Hansen	12,86	3,33	1,11	8,92
<i>Mucor racemosus</i> Zycha	-	-	-	7,14
<i>Penicillium</i> sp. 1	1,63	-	-	-
<i>Penicillium mirabile</i> Beliakova & Milko	0,43	-	-	-
<i>Penicillium purpurogen</i> Stoll	-	11,66	-	-
<i>Penicillium restrictum</i> Gilman & Abbott	8,44	1,66	-	-
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenberg: Fries) Vuillemin	-	-	-	0,89
<i>Scytalidium</i> sp.	2,19	-	-	-
<i>Trichoderma atroviride</i> Bissett	-	3,33	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	3,92	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.3	-	1,66	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.4	-	1,66	11,66	-
<i>Trichoderma</i> sp.6	0,44	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.8	4,6	-	-	6,25
<i>Trichoderma</i> sp.9	-	1,66	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.12	2,97	8,33	6,11	8,92
<i>Trichosporium</i> sp.	-	-	-	10,71
<i>Ulocladium botrytis</i>	-	13,33	-	-
<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuillemin	5,97	-	-	-
Micelio hialino estéril	3,21	-	-	-
Total de aislamientos	61	60	180	112
Total de taxa	20	14	6	10

3.1. Índice de mínima similitud

La comparación entre las comunidades de hongos filamentosos previo a la aplicación de vinaza y posterior a la aplicación de la misma fue realizada mediante el porcentaje de mínima similitud.

Sitio 1. Se observa que las comunidades de hongos filamentosos varían ampliamente en el tiempo ya que el porcentaje de similitud encontrado en el estado inicial respecto a las muestras tomadas en la parcela control es del 34 % (Tabla 12). Valores de baja similitud también se observan entre los tratamientos y las muestras en estado inicial. Con la aplicación de vinaza se obtuvo una similitud mayor al 50 % en los dos tratamientos con respecto al control. El mayor porcentaje de similitud se observa entre los dos tratamientos, el cual corresponde al 65,95 % (Tabla 12).

Tabla 12. Índice de mínima similitud entre las comunidades de hongos filamentosos de muestras de suelo del sitio 1

Sitio 1			
	Parcela control	Vinaza (150 m ³ /há)	Vinaza (450 m ³ /há)
Tiempo 0 día	34	37,72	10,48
Parcela control		55,97	51,89
Vinaza (150 m ³ /há)			65,96

Sitio 2. En este caso también se dio una gran variación de la comunidad en el tiempo dada por una similitud del 19,11 % entre las muestras previas a la aplicación de vinaza y la parcela control (tabla 13). Valores de similitud aún menores se encontraron entre los tratamientos y las muestras en el estado inicial. Luego de la aplicación de vinaza se observaron diferentes comportamientos entre los dos tratamientos respecto al control. La aplicación de 150 m³/há presentó una similitud del 54,53 % con el control, mientras que el tratamiento de 450 m³/há mostró una menor similitud ya que la misma fue del 16,76 % respecto al control. Entre los tratamientos también se obtuvo una baja similitud (tabla 13).

Tabla 13. Índice de mínima similitud entre las comunidades de hongos filamentosos de muestras de suelo del sitio 2

Sitio 2			
	Parcela control	Vinaza (150 m ³ /há)	Vinaza (450 m ³ /há)
Tiempo 0 días	19,11	5,83	9,56
Parcela control		54,53	16,76
Vinaza (150 m ³ /há)			13,86

3.2. Análisis de correspondencia para hongos filamentosos

Para establecer la relación entre la composición de especies fúngicas con el tiempo y el tipo de tratamiento aplicado en cada parcela se realizó un análisis de correspondencia para cada sitio. Para este análisis se utilizaron todos los valores obtenidos del porcentaje de densidad relativa. En este tipo de ordenación las diferencias que se observan representan cambios en la composición de especies y en la abundancia.

Sitio 1. La figura 25 muestra la ordenación en los primeros dos ejes que corresponden al 90 % de la variación total. En el eje 1 que explicó el 60 % de la variación se observó un ordenamiento de las muestras por el tiempo de muestreo, separando las muestras de tiempo cero (To) de las tomadas a los 33 días. *Cunninghamella elegans*, *Mucor racemosus*, *Mucor circinelloides*, *Tielavia terricola*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma* sp.1, *Trichoderma* sp.2, *Aureobasidium* sp. y *Zygorhynchus moelleri* se asociaron a la composición inicial de la comunidad fúngica (To). El eje 2 que explicó el 30 % de la variación estableció un gradiente entre las muestras luego de la aplicación de vinaza, separando claramente la parcela control de las de los tratamientos. Dentro de este gradiente *Mortierella ramaniana*, *Eupenicillium javanicum*, *Mucor hiemalis*, *Eupenicillium abidjanum* y *Rhizopus stolonifer* caracterizaron a la parcela control (Vo). *Chaetomium* sp. y *Cladosporium* sp. se asociaron al tratamiento con 150 m³/há mientras que *Trichoderma* sp.3 y *Eupenicillium brefeldianum* se asociaron con el tratamiento de 450m³/há.

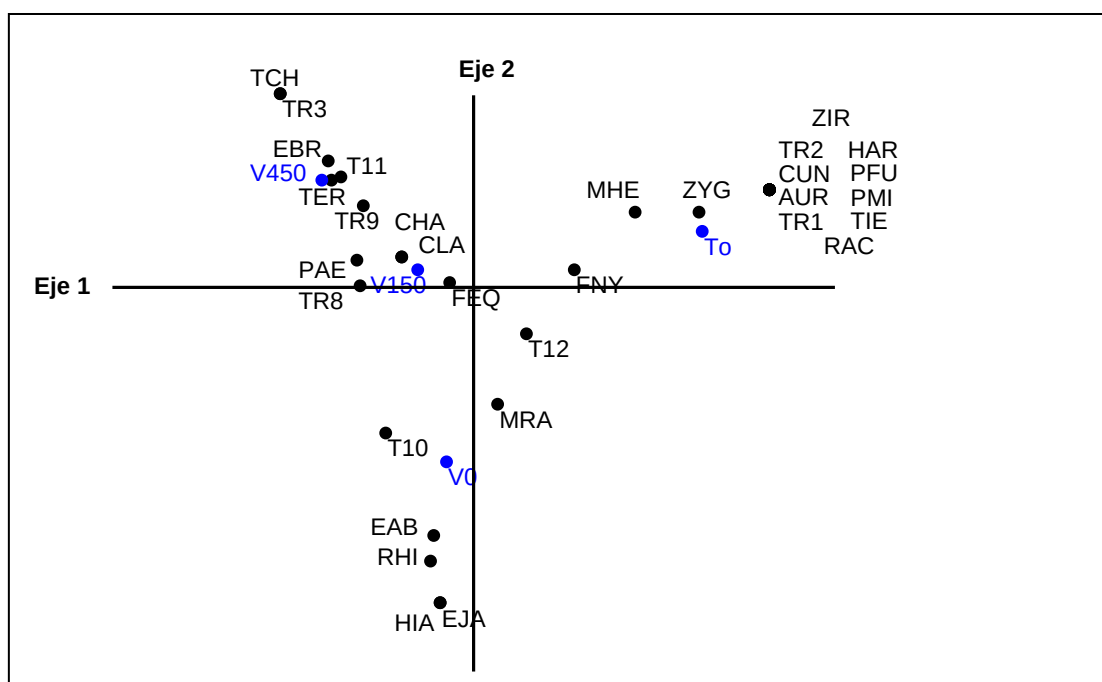


Figura 25. Análisis de correspondencia entre los diferentes tratamientos, muestreos y aislamientos de hongos filamentosos obtenidos de muestras del suelo del sitio 1. TER-*Aspergillus terreus*; AUR-*Aureobasidium* sp.; CHA-*Chaetomium* sp.; CLA-*Cladosporium* sp.; CUN-*Cunninghamella elegans*; EAB-*Eupenicillium abidjanum*; EBR-*Eupenicillium brefeldianum*; EJA-*Eupenicillium javanicum*; FEQ-*Fusarium equiseti*; FNY-*Fusarium nygamai*; MRA-*Mortierella ramaniana*; HIA-*Mucor hiemalis*; RAC-*Mucor racemosus*; ZIR-*Mucor circinelloides*; PAE-*Paecilomyces* sp.; PFU-*Penicillium* sp.1; PMI-*Penicillium minioluteum*; RHI-*Rhizopus stolonifer*; TIE-*Tielavia terricola*; HAR-*Trichoderma harzianum*; TR1- *Trichoderma* sp.1; TR2-*Trichoderma* sp.2; TR3-*Trichoderma* sp.3; TR8-*Trichoderma* sp.8; TR9-*Trichoderma* sp.9; T10-*Trichoderma* sp.10; T11-*Trichoderma* sp.11; T12-*Trichoderma* sp.12; TCH-*Trichosporium* sp.; ZYG-*Zygorhynchus moelleri*; MHE-Micelio hialino esteril. To: Muestreo a tiempo 0; V450 y V150: muestras a los 33 días de aplicación de vinaza 450 y 150 m³/há respectivamente; V0: muestras parcela control sin aplicación de vinaza tomadas a los 33 días de los tratamientos. El eje 1 (horizontal) explicó el 60 % de la variabilidad y el eje 2 (vertical) el 30 %.

Sitio 2. La ordenación en los primeros dos ejes que corresponden al 81 % de la variación total se muestra en la figura 26. La distribución en este caso fue similar que para el sitio anterior. El eje 1 explicó el 44 % de la variación separando las muestras por el tiempo de muestreo salvo para el tratamiento con 450 m³/há el cual se ubicó cercanamente en este eje con el muestreo a tiempo 0. Las especies que caracterizaron a To fueron: *Penicillium restrictum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium nygamai*, *Eupenicillium erubescens*, *Scytalidium* sp, *Epicoccum purpurascens*, *Zygorhynchus moelleri*, *Trichoderma* sp.6, *Penicillium mirabile*, *Trichoderma harzianum*, *Exophiala* sp, *Aspergillus terreus*, *Penicillium* sp. 1, *Curvularia lunata*.

El eje 2 que explicó el 38 % de la variación estableció un gradiente entre las muestras luego de la aplicación de vinaza, ubicando al tratamiento de 150 m³/há sobre el origen de este eje, y separando a la parcela control del tratamiento con 450 m³/há. *Eupenicillium javanicum*, *Mucor racemosus* y *Trichoderma harzianum* caracterizaron la parcela control mientras que *Eupenicillium brefeldianum*, *Trichoderma* sp.4 y *Alternaria alternata* caracterizaron el tratamiento con 150m³/há. El tratamiento con 450m³/há se

asoció con *Cladosporium* sp., *Fusarium avenaceum*, *Penicillium purpurogen*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma* sp.3, *Trichoderma* sp.9 y *Ulocladium botrytis*.

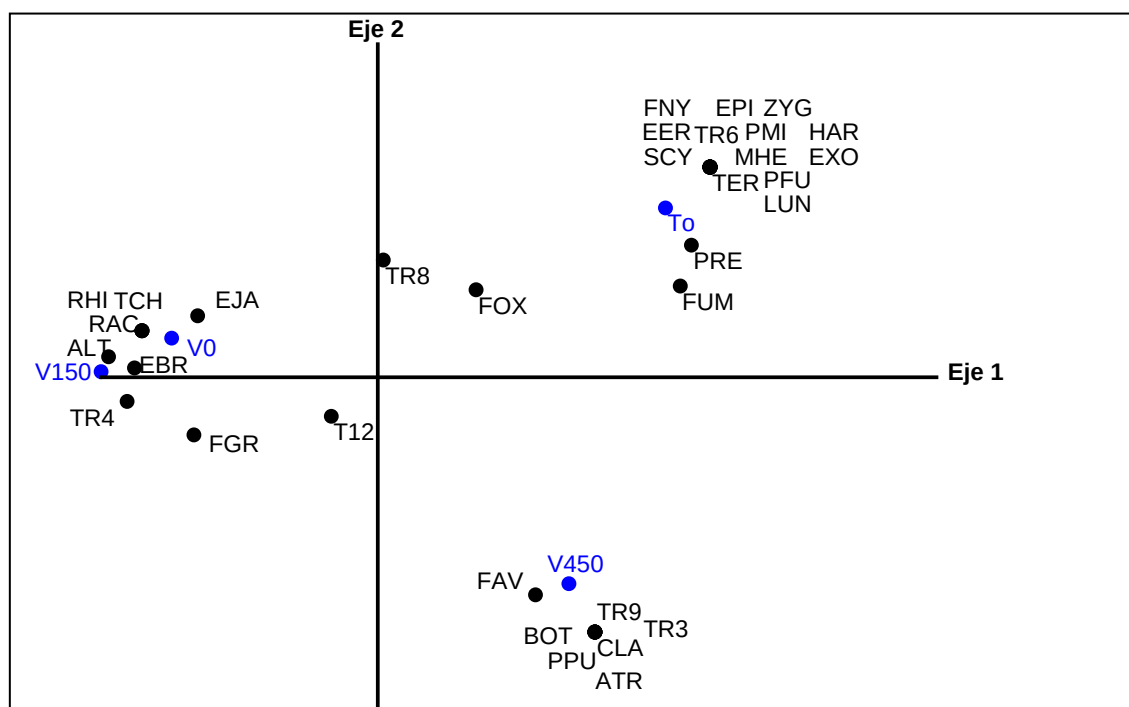


Figura 26. Análisis de correspondencia entre los diferentes tratamientos, muestreos y aislamientos de hongos filamentosos obtenidos de muestras del suelo del sitio 2. ALT-*Alternaria alternata*; FUM-*Aspergillus fumigatus*; TER-*Aspergillus terreus*; CLA-*Cladosporium* sp.; LUN-*Curvularia lunata*; EPI-*Epicoccum purpurascens*; EBR-*Eupenicillium brefeldianum*; EER-*Eupenicillium erubescens*; EJA-*Eupenicillium javanicum*; EXO-*Exophiala* sp.; FAV-*Fusarium avenaceum*; FGR-*Fusarium graminearum*; FNY-*Fusarium nygamai*; FOX-*Fusarium oxysporum*; RAC-*Mucor racemosus*; PFU-*Penicillium* sp. 1; PMI-*Penicillium mirabile*; PPU-*Penicillium purpurogen*; PRE-*Penicillium restrictum*; RHI-*Rhizopus stolonifer*; SCY-*Scytalidium* sp.; ATR-*Trichoderma atroviride*; HAR-*Trichoderma harzianum*; TR3-*Trichoderma* sp.3; TR4-*Trichoderma* sp.4; TR6-*Trichoderma* sp.6; TR8-*Trichoderma* sp.8; TR9-*Trichoderma* sp.9; T12-*Trichoderma* sp.12; TCH-*Trichosporium* sp.; BOT-*Ulocladium botrytis*; ZYG-*Zygorhynchus moelleri*; MHE-Micelio hialino esteril. To: Muestreo a tiempo 0; V450 y V150: muestras a los 50 días de aplicación de vinaza 450 y 150 m³/há respectivamente; V0: muestras parcela control sin aplicación de vinaza tomadas a los 50 días de los tratamientos. El eje 1 (horizontal) explicó el 44 % de la variabilidad y el eje 2 (vertical) el 38 %.

DISCUSIÓN

1. Abundancia de bacterias cultivables en suelos con diferentes dosis de vinaza aplicada

Para poder evaluar el efecto que la vinaza tiene sobre los microorganismos del suelo se determinó la abundancia de varios grupos microbianos cultivables mediante recuento en placa, previo y posterior a la aplicación de diferentes dosis de la misma en dos suelos de composición diferente. Este es un método utilizado tradicionalmente, y aunque posee ciertas limitaciones permite obtener información sobre el componente heterótrofo activo dentro de una población o comunidad (Kirk *et al.*, 2004).

La abundancia de bacterias heterótrofas totales determinadas mediante recuento en placa previo a los tratamientos con vinaza se ubicó en el orden de 10^7 - 10^8 UFC/g suelo seco para el sitio 1 y 10^7 UFC/g suelo seco para el sitio 2. Se pudo constatar una alta homogeneidad en cuanto a la abundancia de este grupo de bacterias entre las parcelas analizadas para cada sitio. Esto es reflejo de la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas. Valores promedio de 8×10^8 UFC/g de suelo de este grupo de bacterias fueron encontrados por Shukla *et al.* (2008) en suelos cultivados con caña de azúcar en la India. En tanto que en suelos de pradera en Uruguay se reportaron valores promedio de $2,5 \times 10^7$ UFC/g suelo (Bajsa, 2008). Luego de los tratamientos con vinaza, no se observaron cambios en cuanto a la abundancia de estas poblaciones para ninguno de los dos sitios, respecto a sus correspondientes parcelas control. Esto puede implicar que la población se mantuvo estable ante el agregado de vinaza o que cambios generados se dieron con anterioridad a la toma de las muestras (33 o 50 días posterior a los tratamientos para sitio 1 y 2 respectivamente) y la población volvió a su estado original al momento de los muestreos. Estudios realizados por Salamanca (2008) en el cual se determinó la biomasa microbiana a los 75 días de aplicación de vinaza mostraron un importante incremento de la misma respecto al control. Sin embargo esta disminuía y se igualaba al control a los 150 días del tratamiento. Orlando (1983) encontró una alta proliferación de microorganismos en los suelos tratados con vinaza, esta proliferación fue intensa hasta los 30 días posteriores a la aplicación, tendiendo a caer posteriormente. En otros estudios realizados en India, en el cual se adicionaban a suelos agrícolas lodos del tratamiento de residuos de destilerías, se observó un importante aumento en el número de bacterias heterótrofas con diferentes cantidades aplicadas (Tripathi, 2011). La vinaza posee altas cantidades de materia orgánica asimilable, pero de todas formas

el crecimiento microbiano depende de otras variables. El nitrógeno puede ser un limitante al momento del crecimiento. Con la adición de nitrógeno al suelo se ha observado un aumento en la incorporación de carbono proveniente de restos vegetales, pero con concentraciones de N inferiores al 1,2 % no se observaron cambios en el crecimiento de la biomasa microbiana (Sanomiya *et al.*, 2006). Es de mencionar que en el tratamiento con 300 m³/há en el sitio 1 se observó un aumento significativo de las bacterias heterótrofas en el tiempo. Este aumento puede deberse a que en esta parcela (y en la de 450 m³/há) el tapado de las semillas de caña fue posterior a las otras parcelas del mismo sitio y muy próximo al muestreo. Una mínima alteración del sistema edáfico puede llevar a cambios en el ambiente con una subsecuente alteración de la actividad microbiana (Murphy *et al.*, 2007). Igualmente, el retraso en el tapado pudo llevar a un retraso en la germinación de las semillas. Dependiendo de la etapa del cultivo, el efecto rizosférico puede ser importante ya que la microbiota es estimulada o inhibida por exudados radicales (Carrillo, 2003).

En cuanto a las actinobacterias se determinaron poblaciones del orden de 10⁶-10⁷ UFC/g suelo seco para el sitio 1 y 10⁶ UFC/g suelo seco para el sitio 2 previo a los tratamientos. Se observó en el sitio 1 una variabilidad en la abundancia de este grupo entre las parcelas, pero no fue así para el sitio 2. Estudios sobre la diversidad de microorganismos del suelo resaltan la gran heterogeneidad innata del suelo y la distribución espacial de los microorganismos (Kirk *et al.*, 2004). Valores promedios de 5 x 10³ UFC/g de suelo fueron reportados por Shukla *et al.* (2008) en suelos cultivados con caña de azúcar en India, mientras que en dos suelos con cultivos de maíz en Colombia se obtuvieron valores promedios de 3,4 x 10⁴ y 8,0 x 10⁴ UFC/g de suelo (Montenegro, 2008). Estos valores se encuentran muy por debajo de los obtenidos en este trabajo. Por otro lado, en suelos de praderas del Uruguay el número de actinobacterias obtenidos por recuento en placa se ubicó entre 4 x 10⁶ y 6 x 10⁷ UFC/g de suelo (Bajsa, 2008). Este último resultado se asemeja más a los obtenidos en este trabajo.

Con la aplicación de vinaza, en el sitio 2 se mantuvo el número de esta población sin diferencias respecto al control. Sin embargo, en el sitio 1 se pudo determinar un aumento significativo en los tratamientos con 300 y 450 m³/há respecto al control. El mayor efecto se observó en el tratamiento con 300 m³/há en el cual se incrementó un orden de magnitud el número de actinobacterias en el muestreo a los 33 días respecto al inicial. Estudios realizados por Meng *et al.* (2009) en el cual aplicaban vinaza sobre cultivos de caña de azúcar se observó un incremento en la población de actinobacterias de 242 veces respecto al control. Sin embargo en suelos colombianos

no se observaron cambios con la aplicación de vinaza sobre esta población de microorganismos (Montenegro, 2008). Las diferencias observadas en los dos suelos pueden relacionarse con las características del mismo. El suelo 2 posee una mayor cantidad de arcilla que el suelo 1 en el horizonte A, siendo franco arcilloso y franco arcillo-arenoso respectivamente. La arcilla tiene mayor capacidad para retener las moléculas orgánicas con lo que se incrementa la densidad del suelo. Estudios realizados por Tejada y González (2005) han puesto de manifiesto una correlación entre la densidad del suelo y la biomasa microbiana. En este estudio observaron que cuando aplicaban altas dosis de vinaza, la densidad del suelo aumentaba y disminuía la biomasa microbiana. En cambio, con bajas dosis de vinaza, la densidad del suelo disminuía y aumentaba la biomasa microbiana. Este efecto podría ser el responsable de los diferentes resultados obtenidos en la abundancia de actinobacterias entre los dos sitios.

El porcentaje de actinobacterias respecto a los heterótrofos totales mostró valores entre 6-12 % en el sitio 1 y entre 11-18 % para el sitio 2 previo a los tratamientos. En este último, luego de la aplicación de vinaza la proporción se mantuvo estable, mientras que en el sitio 1 se observó un aumento en el tratamiento con 150m³/há respecto al control duplicándose en el tiempo. Este hecho puede explicarse debido a que la población total de heterótrofos se mantuvo estable en el tiempo para este tratamiento mientras que las actinobacterias duplicaron su número. De todas formas este último efecto no fue significativo en el tiempo pero sí se ve cuando se analiza la relación de actinobacterias respecto a heterótrofos.

2. Abundancia y estructura de la comunidad de hongos filamentosos

La abundancia de hongos filamentosos al inicio del ensayo mostró valores del orden de 10⁵ y 10⁴ UFC/g de suelo seco para el sitio 1 y 2 respectivamente. Estos valores son semejantes a los reportados por Bettucci *et al.* (1993) en suelos de praderas del Uruguay los cuales se encontraron entre 4 x 10⁴ y 6 x 10⁴ UFC/g de suelo seco. En suelos cultivados con caña de azúcar, Shukla *et al.* (2008) reportaron valores promedio de 5,8 x 10³ UFC/g de suelo seco.

En ambos casos se observó una alta homogeneidad entre las diferentes parcelas en cuanto a su abundancia. Para todos los casos se determinaron diferencias significativas en el tiempo en cuanto a la abundancia de hongos filamentosos. Estas diferencias también generaron cambios en la comunidad. El efecto que puede destacarse se observa entre la comunidad inicial y la parcela control. En el sitio 1 la

comunidad al inicio del ensayo que estaba dominada por *Zygorhynchus moelleri*, pasó a estar dominada por *Mortierella ramaniana*, mientras que *Zygorhynchus moelleri* se pudo recuperar con apenas el 0,77 % de densidad relativa en esta última parcela. Para el caso del sitio 2 en el cual la comunidad inicial estaba dominada por *Aspergillus fumigatus*, ésta paso a estar dominada fuertemente por *Alternaria alternata* en la parcela control. Todas estas especies mencionadas son habitantes frecuentes del suelo (Giri *et al.*, 2005). Mediante el análisis de mínima similitud de las comunidades fúngicas entre el estado inicial y luego de los tratamientos se puede reafirmar que el factor tiempo causó un importante efecto en los dos sitios. La comunidad inicial del sitio 1 fue 34 % similar a la parcela control luego de los tratamientos, mientras que para el sitio 2 esta similitud fue del 19,11 %. Aunque la diferencia entre los tiempos de muestreos fue relativamente corta, los mismos fueron realizados próximos a un cambio estacional. Asimismo, la imposición de las plantas de caña de azúcar entre los muestreos pudo influir en los comportamientos observados. Christensen (1969) puso de manifiesto que cambios en la comunidad fúngica del suelo han de ser esperados ante un cambio en la vegetación del mismo. Hay que destacar que *Trichoderma* sp 12. se mantuvo e incluso aumento en el tiempo en los dos sitios. Las especies de *Trichoderma* son capaces de antagonizar y controlar un amplio rango de hongos fitopatógenos, siendo bien conocidos como agentes de control biológico (Sharon *et al.*, 2011).

La aplicación de vinaza generó diferentes comportamientos en los dos tipos de suelos analizados. Mientras que en el sitio 1 se pudo constatar un importante aumento de la abundancia en el tratamiento con 450 m³/há respecto al control, en el sitio 2 se observó lo contrario. En éste último el tratamiento con 450 m³/há exhibió valores menores al control. Este resultado diferencial entre los dos tipos de suelos analizados se asemeja al obtenido para el caso de las actinobacterias, lo cual puede reforzar la hipótesis mencionada para tal caso. Estas diferencias también generaron cambios en la comunidad. La aplicación de vinaza en el sitio 1 estimuló fuertemente a *Paecilomyces* sp. el cual paso a ser dominante en las parcelas con los tratamientos. De todas formas también se pudo recuperar de la parcela control con una alta densidad relativa, lo que indica que factores ajenos a la vinaza también estimularon a esta especie. En cambio en el sitio 2, se observó que la aplicación de 150 m³/há de vinaza no afectó la población de *Alternaria alternata* el cual fue dominante en esta parcela como en la control. Sin embargo, el tratamiento con 450 m³/há disminuyó drásticamente a *Alternaria alternata* siendo de las especies con menor densidad relativa en esta parcela. En este caso la especie que se vio altamente estimulada fue

Cladosporium sp. siendo dominante y apareciendo exclusivamente en este tratamiento.

Los tratamientos con vinaza en ambos sitios generó comportamientos diferentes pudiéndose destacar: en el sitio 1 *Paecilomyces* sp. aumentó proporcionalmente a la cantidad de vinaza aplicada, mientras que *Rhizopus stolonifer* y *Mortierella ramaniana* disminuyeron con la cantidad de vinaza aplicada. En el sitio 2 apareció *Cladosporium* sp. en el tratamiento de mayor cantidad de vinaza mientras que este tratamiento disminuyó drásticamente a *Alternaria alternata*. *Fusarium oxysporum* y *Trichosporium* sp. disminuyeron con la cantidad de vinaza aplicada. El efecto sobre *Fusarium oxysporum* no concuerda con datos reportados por Vicente *et al.* (2007) quienes estudiaron el efecto de varios tipos de vinaza sobre hongos fitopatógenos. En particular, la vinaza de caña de azúcar estimulaba el crecimiento de dichos hongos dentro de los cuales se incluía *Fusarium oxysporum*. Un hecho en común entre los dos sitios que se pudo determinar fue el aumento de *Eupenicillium brefeldianum* con la aplicación de 150 m³/há vinaza. Este último ha sido aislado tanto de praderas como de suelos con cultivos (Domsch *et al.*, 1980).

Es de mencionar que las especies encontradas en este trabajo han sido reportadas en suelos del Uruguay, sin embargo se encuentra poca similitud en cuanto a la estructura de la comunidad fúngica reportada en praderas y montes de *Eucalyptus* del Uruguay (Bettucci *et al.*, 1993; Bettucci y Alonso, 1995). Por otro lado, la comunidad fúngica encontrada en los dos tipos de suelos en este trabajo comparte más del 50 % de la encontrada en campos de cultivos de nogal y alfalfa en suelos mexicanos (Samaniego y Chew, 2007).

Debido a que no existen trabajos en cuanto al efecto de la aplicación de vinaza sobre la comunidad de hongos filamentosos en suelos se hace imposible poder comparar los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se evaluó el comportamiento de varios grupos microbianos del suelo ante la aplicación de diferentes dosis de vinaza. Se determinó que la población de actinobacterias en el sitio 1 aumentó con la aplicación de 300 y 450 m³/há de vinaza mientras que esta población no se vio afectada en el sitio 2. La abundancia de hongos filamentosos aumentó con 450 m³/há de vinaza en el sitio 1 mientras que disminuyó con esa misma dosis en el sitio 2. La población de bacterias heterótrofas totales no mostró diferencias en ninguno de los sitios. Los resultados obtenidos indican que la vinaza genera efectos diferentes sobre diferentes tipos de microorganismos. A su vez, los efectos dependen de la dosis y del tipo de suelo en la que es aplicada. Esto concuerda con resultados obtenidos en otros países. No se pudo observar un comportamiento específico de la vinaza sobre la estructura de la comunidad de hongos filamentosos, pero se determinó que la misma cambió con la aplicación de vinaza. En cada tipo de suelo se vieron estimuladas algunas especies mientras que otras fueron inhibidas. El resultado en común entre ambos tipos de suelos fue el incremento de *Eupenicillium brefeldianum* con la aplicación de 150 m³/há de vinaza. A su vez el factor tiempo generó grandes cambios en la comunidad de hongos filamentosos en los dos suelos analizados. Es de mencionar que los estudios realizados en este trabajo evaluaron el efecto de la vinaza a corto plazo mientras que efectos diferentes podrían observarse posteriormente. Debido a esto sería importante un seguimiento de la evolución de las variables analizadas en el tiempo. Asimismo, evaluar el efecto sobre la estructura de la comunidad bacteriana aportaría mayor información sobre los cambios que puedan darse, por lo que sería de gran importancia evaluar el efecto sobre la diversidad bacteriana. Hay que tener en cuenta que el análisis microbiano fue realizado mediante técnicas dependientes de cultivo. Sería importante poder evaluar la comunidad microbiana por técnicas independientes de cultivo. Utilizando métodos moleculares se podría obtener información también de los microorganismos no cultivables que podrían estar siendo afectados. Los efectos de las alteraciones en el sistema edáfico sobre los microorganismos son muchas veces evaluadas mediante la actividad de enzimas específicas, por lo que sería interesante poder evaluar este parámetro en futuras experiencias. Además, la biomasa y respiración microbianas serían medidas con gran aporte de información para poder comprender con más amplitud el efecto de la vinaza sobre los microorganismos del suelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos C. J., Mims C. W. y Blackwell M.** 1996. Introductory mycology. John Wiley & Sons, New York.
- ALUR.** 2012. <http://www.alur.com.uy/ley18195.html>.
- Álvarez González A., García-Giménez R., Casares I., y Jiménez Ballesta R.** 2007. Posibilidades de aplicación de vinazas en suelos rojos de La Mancha (España). Revista Pilquen, **8**: 1 - 16.
- Bajsa N.** 2008. Efecto del pastoreo bovino sobre la comunidad bacteriana en un suelo de pradera natural. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias – UDELAR.
- Bautista Guerrero H.H., y Valdés M.** 2008. *Frankia* y la simbiosis actinorrízica. Revista Latinoamericana de Microbiología, **50**: 90 – 102.
- Bettucci L., Rodriguez C. y Indarte R.** 1993. Fungal communities of two grazing-land soils in Uruguay. Pedobiología, **37**: 72-82.
- Bettucci L., y Alonso R.** 1995. The effect of wildfire on the opportunistic decomposer fungal community of a Uruguayan *Eucalyptus* spp. forest. Pedobiología, **39**: 470 – 480.
- Bettucci, L. y Roquebert, M.F.** 1995 Microfungi from a tropical rain forest litter and soil: a preliminary study. Nova Hedwigia, **61**: 111-118.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D.** 1994. Laboratory Manual for Fusarium Research, 3rd Edition. Department of Crop Science, University of Sydney/Royal Botanic Gardens,
- Carlile M. J., Watkinson S. C. y Gooday G. W.** 2006. The fungi. Elsevier Academic Press. 2^{da} edición, Londres.
- Carlile M.J., Watkinson S.C. y Gooday G.W.** 2001. The fungi. Academic Press, 2^{da} edición, Londres.
- Carrillo L.** 2003. Microbiología agrícola. Universidad Nacional de Salta.

- Christensen, M.** 1969. Soil microfungi of dry to mesic conifer hardwood forests in Northern Wisconsin. *Ecology*, **50**: 9 – 27.
- Cuellar A.I., Villegas D.R., León O.M., y Pérez I.H.** 2002. Manual de fertilización de la caña de azúcar en Cuba. Publica. La Habana, Cuba. p 88 - 92.
- Dighton J.** 2003. Fungi in ecosystem processes. New York: Marcel Dekker.
- Domsch K.H., Gams W., y Anderson D.C.** 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, Londres.
- Doran J.W., y Zeiss M.R.** 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, **15**: 3-11.
- Ellis M.B.** 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Principal Mycological Institute, Kew, Surrey, Inglaterra.
- Emmerling C., Schlöter M., Hartmann A., y Kandeler E.** 2002. Functional diversity of soil organisms – a review of recent research activities in Germany. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **168**: 408 – 420.
- Errea E., y Méndez I.** 2011. Azúcar: Cultivo de caña y producción industrial. Trabajos especiales, N° 303 (MGAP).
- Franco Correa M.** 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.
- Frioni, L.** 2006. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Giri B., Houn P., Kumari R., Prasad R., y Varma, A.** 2005. Microbial diversity in soils. *Soil Biology*, **3**: 19-55.
- González V., y Pomares F.** 2008. La fertilización y el balance de nutrientes en sistemas agroecológicos. Sociedad española de agricultura ecológica, Catarroja (Valencia).

- Hamdali H., Hafidi M., Virolle M.J., y Ouhdouch Y.** 2008. Rock phosphate-solubilizing actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**: 2565–2575.
- Hammer Ø., Harper D.A.T, y Ryan P.D.** 2001. PAST: Paleontological Statistic Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, **4(1)**. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Hernández Melchor G. I., Salgado García S., Palma López D. J., Lagunes Espinoza L., Castelán Estrada M. y Ruiz Rosado O.** 2008. Vinaza y composta de cachaza como fuente de nutrientes en caña de azúcar en un gleysol mólico de Chiapas, México. *Interciencia*. **33**: 855-860.
- Janssen P.H.** 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**:1719-1728.
- Kennedy A.C.** 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **74**: 65-76
- Kennedy A.C., y Smith K.L.** 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, **170**: 75-86.
- Kirk J. L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., y Trevors J.T.** 2004. Methods for study soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, **58**: 169-188.
- Klich A.M.** 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda.
- Korndörfer G.H.** 2007. Valor fertilizante da vinhaça para cana de açúcar. Unversidade Federal Uberlandia, Brasil.
- Korndörfer G.H., Nolla A., Waldo A., y Lara C.** 2004. Impacto ambiental del uso de la vinaza en la agricultura y su influencia en las características químicas y físicas del suelo. En: Encuentro sobre vinazas, potasio y elementos menores para una agricultura sostenible. Corpoica, Palmira, Colombia.
- Krebs, J. R.** 1989. Ecological methodology. HarperCollins, New York.

- Leoni, C. y Ghini R.** 2003. Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. Fitopatologia Brasileira. **28**: 67-75.
- Mayea S., Novo, R., y Valiño, A.** 1991. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Pueblo y Educación, Cuba.
- McCarthy A.J. y Williams S.T.** 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. Gene, **115**: 189–192.
- Meng Y.,Tang Q.,Liu Z.,Chen G.,Wang Y., y Tan Y.** 2009. Effects of filter mud and vinasse from sugar factory on quantity of soil microorganism in sugarcane field. Guangxi Agricultural Sciences. Vol 40. Nº 10. doi: CNKI:SUN:GXNY.0.2009-10-013.
- Miao V., y Davies J.** 2010. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. Antonie van Leeuwenhock, **98**: 143 – 150.
- Montenegro Gómez S.P., Menjivar Flórez J.C., Bonilla Correa C.R., Madriñan Molina R.** 2009. Influencia de la aplicación de vinaza en actividad y biomasa microbiana en un Entic Dystropept y un Fluventic Haplustoll del Valle del Cauca, Colombia. Acta Agronómica, **48**: 41- 45.
- Montenegro S.P.** 2008. Influencia de la aplicación de vinaza sobre la presencia, actividad y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de maíz dulce (*Zea Mays*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia.
- Mueller G., Bills G., y Foster, M.** 2004. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, Londres.
- Murphy D.V, Stockdale E.A., Brookes P.C., y Goulding K.W.T.** 2007. Impact of microorganisms on chemical transformations in soil. En: Soil biological fertility - A key to sustainable land use in agriculture. L.K. Abbott y D.V. Murphy (eds). Springer, 37-59.
- Orlando Fo J.** 1983. Sistemas de aplicação de vinhaça em cana de açúcar. Alcohol e Açúcar, Sao Paulo. **1**: 28 - 32.

- Pathom-aree W., Stach James E. M., Ward Alan C., Horikoshi K., Bull Alan T., y Goodfellow M.** 2006. Diversity of actinomycetes isolated from challenger deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, **10**:181–189.
- Paul E.A.** 2007. Soil microbiology, ecology, and biochemistry. Academic Press, 3^{era} Edición.
- Pitt J.I.** 1979. The genus *Penicillium* and its telomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London Academic Press Inc. Londres.
- PNUMA.** 2010. Un caso para un enfoque más equilibrado en la producción de Bioenergía para reducir el riesgo a la biodiversidad y maximizar el potencial de mitigación del cambio climático. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- Salamanca Romero C.A.** 2008. Efecto de las fuentes orgánicas obtenidas de los subproductos agroindustriales de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) y el plátano (*Musa* spp.) sobre la actividad microbiana y enzimática en el suelo. Trabajo de grado presentado para optar el título: Master en Ciencias Agrarias con énfasis en suelos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Samaniego-Gaxiola J.A., y Chew-Madinaveitia Y.** 2007. Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **78**: 383 – 390.
- Sanomiya L.T., Assis L.C., de Oliveira J.A., y Nahas E.** 2006. Mineralización de la paja de caña de azúcar en suelo adicionado con viñaza (subproducto de la industria del alcohol de caña de azúcar) y fertilizante nitrogenado. *Agricultura técnica (Chile)*, **66**: 90-97.
- Schipper M.A.A.** 1977. On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. Studies in Mycology N° 12. Institute of the Royal Netherlands. Academy of Arts and Sciences.
- Sharon E., Chet I., y Spiegel Y.** 2011. *Trichoderma* as a biological control. En: Biological control of plant – parasitic nematodes: building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms. Keith Davies y Yitzhak Spiegel (eds). Springer, 183 – 201.

- Shukla S.K., Yadav R.L., Suman A., y Singh P.N.** 2008. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. *Soil & Tillage Research*, **99**: 158–168
- Smit, E., P. Leeflansg, S. Gommans, J. van den Broek, S. van Mil y K. Wernars.** 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2284-2291.
- Stackebrandt, E., C., Sproer F. Rainey A., Burghardt J., Pauker O. y Hippe H.** 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**: 1134–1139.
- Stackebrandt, S. P.** 2000. The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. Springer-Verlag, New York, NY.
- Tejada M. y Gonzalez J.L.** 2005. Beet vinasse applied to wheat under dryland conditions affects soil properties and yield. *European Journal of Agronomy*, **23**: 336–347.
- Tripathi B.D.** 2011. A short term study on toxic effects of distillery sludge amendment on microbiological and enzymatic properties of agricultural soil in a tropical city. *Journal of Earth Science and Climate Change*, **1**:106. doi:10.4172/2157-7617.1000106.
- Turco R.F., Kennedy A.C., y Jawson M.D.** 1994. Microbial indicators of soil quality. En: *Defining soil quality for a sustainable environment*. Doran J.W., Coleman D.C., Bezdicek D.F., y Stewart B.A. (eds). Soil Science Society of America, Madison, WI, USA. Publicación especial, **35**: 73–90
- Valdes A.** 2007. Los residuales líquidos de la producción del alcohol. Taller gestão de energia e residuos na agroindústria socroalcoholeira. Red temática IVH. Empleo de la biomasa azucarera como fuente de alimento energética, derivados y su relación con la preservación del medio ambiente (BAZDREAM). Pirassununga, Brasil.

- van Elsas J.D, Garbeva P., y Salles J.** 2002. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation*, **13**: 29–40
- van Oorschot C.A.N.** 1980. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. Studies in Mycology Nº 20. Institute of the Royal Netherlands. Academy of Arts and Letters.
- Venkateswarlu B., y Srinivasarao Ch.** 2005. Soil Microbial Diversity and the Impact of Agricultural Practices. http://www.envismadrasuniv.org/oct_news.htm.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F, y van Sinderen D.** 2007. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**: 495–548.
- Vicente N., Santos M., Vicente Nelly, Diáñez F., de Cara M., y Tello J.C.** 2007. Vinazas y hongos del suelo. *Agroecología*, **2**: 39 – 45.
- Webster J., y Weber R.W.S.** 2007. Introduction to fungi. Cambridge University Press, 3ª edición.