



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Facultad de Ciencias



Facultad de Ciencias
Universidad de la República

**Trabajo de Tesis presentado para obtener el título de
Magíster en Biotecnología**

**Estudio de las comunidades bacterianas
de diversos vermicomposts mediante**

T-RFLP

Omar Robledo D'Angelo

Orientadores: **Dra. Claudia Etchebehere**
 Dr. Diego Lercari

Tribunal: **Dra. Silvana Vero**
 Dra. Ing. Agr. Margarita Sicardi
 Dr. Ing. Agr. Roberto Zoppolo

Montevideo, Marzo de 2009

Agradecimientos

En primer lugar más que agradecer, quisiera rendir un homenaje a quien fuera un gran Profesor, Compañero y Amigo, el honorable Dr. Horacio Vera Ziegler, quien fue una de las primeras personas que brindó un apoyo incondicional para que el presente trabajo se pudiera llevar a cabo.

A Enzo Grosso por haber estado junto conmigo en la creación de esta idea que hoy se transforma en resultado.

A mis tutores, Claudia y Diego por haber tenido la mayor de las paciencias para enseñarme lo que aprendí.

A la comisión de Maestría en Biotecnología por el apoyo brindado en estos años, especialmente a la Dra. Sabina Vidal quien compartió espacio y equipos en su laboratorio. A todo el grupo de Biología Molecular Vegetal por brindar su compañerismo y amistad.

A INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) por haber financiado el proyecto: “Vermicompostaje de desechos agropecuarios (cáscara de arroz, estiércoles y hortifrutícolas) para supresión de damping-off en almácigos de especies hortícolas (tomate, morrón y lechuga)”.

A CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica de la UDELAR) por haber financiado los proyectos: “Elaboración de sustratos y fertilizante orgánico para hortifruticultura mediante la biotecnología del Vermicompostaje de desechos agroindustriales” y “Manejo de la biota edáfica (microflora y microfauna) en hortifruticultura intensiva bajo cubierta: mejora de los factores de fertilidad y sanidad a través de la aplicación de vermicompuestos” Toda esta financiación permitió el desarrollo de esta Tesis.

A los Señores Productores José Luís Ratto y Javier Rizo, por haber abierto las puertas de sus establecimientos para realizar parte de este trabajo.

A los productores y empresas que aportaron los vermicomposts.

Dedicado a mi Familia, a mi esposa Natalia y a mis hijos Romina, Valentín y Francisco que estuvieron en este “barco” tanto en las buenas como en las malas. También a mis Padres Omar y Lina que me alientan siempre a seguir avanzando.

Me complace haber podido contribuir con un pequeño granito de arena hacia el desarrollo de tecnologías sustentables para la producción agrícola.

Resumen

En el presente trabajo de tesis se estudiaron las comunidades bacterianas de diversos materiales compostados, obtenidos a partir de distintos materiales orgánicos de desecho y con diferentes manejos productivos como compostaje termófilo y vermicompostaje. Se buscó correlacionar la estructura de la comunidad bacteriana con propiedades de promoción de crecimiento vegetal y supresividad a fitopatógenos asociadas al uso de dichos vermicomposts como enmiendas para suelo y para la elaboración de sustratos para plántulas. Para ello se estudió el efecto de la incorporación de diversos vermicomposts sobre la comunidad bacteriana de un suelo de invernáculo en producción de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Se analizó la comunidad bacteriana mediante Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) del gen ARNr 16S para determinar la correlación entre cambios en la estructura de la comunidad y el rendimiento productivo. Los resultados de este estudio se muestran en el primer capítulo. En el capítulo 2 y en Resultados Complementarios se estudia las comunidades bacterianas por T-RFLP del ARNr 16S de diversos sustratos elaborados en base a diferentes vermicomposts, para determinar si existe una correlación entre la estructura de la comunidad bacteriana y la supresión al mal de almácigos (damping-off) causado por *Rhizoctonia solani* en plántulas de tomate.

Los resultados mostraron que existe una correlación entre la promoción del crecimiento vegetal y la supresión del damping-off con la estructura de las comunidades bacterianas. Mediante la construcción de una librería genómica del ARNr 16S sobre una de las muestras se detectó la presencia de microorganismos benéficos que pueden estar implicados en dichos fenómenos. Estos microorganismos presentaron una correlación con Fragmentos de Restricción Terminales observados en los perfiles T-RFLP. Mediante análisis de restricción in silico se logró también correlacionar estos fragmentos con secuencias de ARNr de 16S (obtenidas a partir de bases de datos) de organismos con conocida

capacidad biocontroladora o de promoción de crecimiento. Los resultados de esta Tesis sugieren que la capacidad de promoción de crecimiento así como de biocontrol de fitopatógenos que poseen algunos materiales compostados se debe a su contenido de microorganismos benéficos para la producción vegetal.

Índice

Contenido	Página
Introducción General	
1. Compostaje de residuos orgánicos	1
2. Biotecnología del vermicompostaje.	3
3. Supresividad de fitopatologías en suelos y composts.	7
4. Estudio de las comunidades microbianas complejas	16
5. Bibliografía	18
Objetivos y estrategia experimental	25
Capítulo 1: Efectos del agregado de vermicomposts a suelo de invernáculo. Estudio sobre: la comunidad bacteriana, la actividad microbiana del suelo y la producción de tomates	
1. Resumen	27
2. Introducción	28
3. Materiales y Métodos	31
3.1 Ensayo en suelo de invernáculo	31
3.2 Determinaciones	32
3.2.1 Análisis químicos de los vermicomposts utilizados en el ensayo en suelo de invernáculo	32
3.2.2 Evaluación de parámetros agronómicos	33
3.2.3 Actividad microbiana del suelo de las parcelas experimentales medida por hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA)	33
3.2.4 Obtención de perfiles T-RFLP del ARNr 16S para el estudio de las comunidades bacterianas del suelo de las parcelas experimentales	33

3.2.5 Análisis de los perfiles de T-RFLP del ARNr 16S del suelo de las parcelas experimentales	34
4. Resultados	35
4.1 Análisis químicos de los vermicomposts utilizados en el ensayo	35
4.2 Evaluación de parámetros agronómicos	36
4.3 Actividad microbiana del suelo de las parcelas experimentales medida por hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA)	37
4.4 Análisis de las comunidades bacterianas del suelo de las parcelas experimentales	39
5. Discusión	42
6. Bibliografía	46

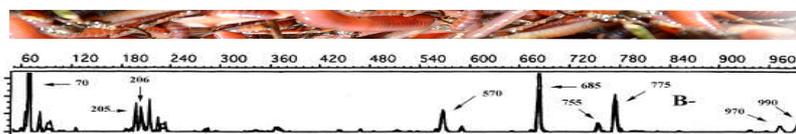
Capítulo 2: Estudio de la relación entre la estructura de la comunidad bacteriana y la capacidad supresiva a *Rhizoctonia solani*, de sustratos en base a vermicomposts

1. Resumen	50
2. Introducción	51
3. Materiales y métodos	54
3.1 Ensayos de supresión a <i>R. solani</i>	54
3.2 Análisis fisicoquímicos de los sustratos	55
3.3 Actividad microbiana medida por hidrólisis de FDA	55
3.4 Obtención de perfiles T-RFLP del ARNr 16S para el estudio de las comunidades bacterianas de los sustratos	56
3.5 Análisis de los perfiles de T-RFLP del ARNr 16S de los Sustratos	
3.6 Construcción de una librería del gen del ARNr 16S y análisis filogenético	58

4. Resultados	59
4.1 Ensayos de supresión a <i>Rhizoctonia solani</i>	59
4.2 Análisis físicoquímicos de los sustratos	60
4.3 Actividad microbiana medida por hidrólisis de FDA	63
4.4 Análisis de la comunidad bacteriana por T-RFLP del ARNr 16S	63
4.5 Análisis multivariados de los datos de T-RFLP del ARNr 16S	63
4.6 Estudio de la comunidad microbiana del sustrato VTA mediante librería del gen del ARNr de 16S	68
4.7 Identificación de los posibles organismos biocontroladores	68
5. Discusión	71
6. Conclusiones	78
7. Bibliografía	78
Resultados complementarios.	
1. Introducción	83
2. Materiales y métodos	83
2.1 Ensayos de supresividad a <i>R.solani</i> en almácigos de plántulas de tomate	83
2.2 Obtención de los perfiles T-RFLP del ARNr 16S	84
2.3 Análisis de Componentes Principales (PCA) con datos del T-RFLP del ARNr 16S	85
3. Resultados	86
3.1 Ensayos de supresividad a <i>R. solani</i> en almácigos de tomate	86
3.2 Análisis de PCA con datos del T-RFLP del ARNr 16S	87
4. Discusión	89
5. Conclusiones	90

Conclusiones generales	91
Perspectivas	94

Introducción General.



1 Compostaje de residuos orgánicos

El compostaje de materia orgánica se definió como la descomposición biológica de los constituyentes orgánicos de los residuos, bajo condiciones controladas (Goleuke, 1972), siendo esto último un componente que distingue a dicho compostaje de la putrefacción que ocurre naturalmente en el medio ambiente. Como principal condición, el proceso debe ser totalmente aeróbico, siendo los productos principales obtenidos: amonio, dióxido de carbono, otros compuestos minerales y sustancias húmicas. En la figura 1 se muestra un modelo de la estructura molecular característica de un ácido húmico (Stevenson. 1982). Todos estos productos son obtenidos gracias a la acción de una compleja mezcla de poblaciones de microorganismos en condiciones de aerobiosis y humedad (Goleuke, 1972).

El proceso de compostaje se puede dividir en tres fases principales:

1. Fase inicial, período de corta duración, en dónde son utilizados los azúcares y otros compuestos simples fácilmente degradables, predominan los microorganismos mesófilos (hongos y bacterias acidificantes) y la temperatura se eleva hasta unos 40°C.

2. Fase termófila, la cual puede durar varias semanas o meses dependiendo del contenido de celulosa y hemicelulosa en el material de partida. En esta fase se alcanzan las más altas temperaturas (60-80 °C), degradándose los polímeros menos complejos. Predominan los microorganismos termófilos y sobrepasando los 60°C, los hongos termófilos responsables de la descomposición de la celulosa y hemicelulosa cesan su actividad (Cooney y Emerson, 1964), sin embargo dado que se produce un gradiente de temperatura, éstos permanecen activos en zonas periféricas. En cuanto a las bacterias termófilas, también tienen un comportamiento similar a los hongos (Chang y Hudson, 1967). Estas al principio descomponen las proteínas y carbohidratos no celulósicos, atacando también los lípidos y hemicelulosas, mientras que la celulosa y lignina ofrecen más

resistencia a su acción (Poincelot, 1972). A medida que la temperatura desciende, la materia orgánica es recolonizada por los hongos termófilos y se alcanza la fase con mayor tasa de degradación, por lo tanto es aquí

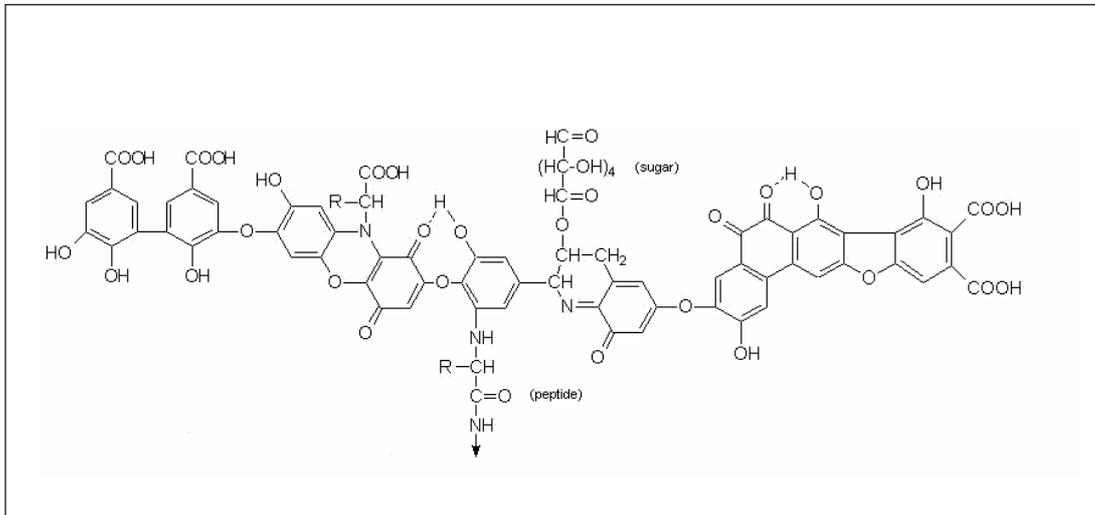


Figura 1. Estructura molecular característica de un ácido húmico (Stevenson, 1982)

dónde se considera relevante brindar las mejores condiciones para acelerar el proceso y obtener un compost de mayor calidad (Hoitink, 1980). Se han considerado como óptimos los siguientes parámetros:

- *niveles de oxígeno del 5 al 12%, mantenido por aireación forzada o con volteos mecánicos
- * temperaturas entre 40 y 50 °C
- *humedad entre 50 y 60 % sobre peso húmedo.
- *pH entre 6.5 y 8.5.

3. Fase de enfriamiento y maduración (curado), la temperatura cae por debajo de los 40°C, y la tasa de descomposición disminuye conforme van desapareciendo los componentes más biodegradables. Los microorganismos mesófilos comienzan a recolonizar (Bagstam, 1978). Aquí comienzan a atacarse los polímeros complejos (ligninas y suberinas).

Esta última fase es fundamental para obtener un compost de buena calidad y se han utilizado ciertos parámetros que permiten establecer cual es el tiempo en el que se puede considerar que el proceso de compostaje ha finalizado. Sin embargo dichos criterios no son aplicables a todos los materiales a compostar (Henry y Harrison, 1996). Algunos de estos criterios son: apariencia y olor, grado de autocalentamiento (self heating), pH, relación lignina/celulosa, relación carbono/nitrógeno (C/N), aumento en la capacidad de intercambio catiónico, presencia de microorganismos indicadores, efectos sobre la germinación y crecimiento vegetal.

2 Biotecnología del vermicompostaje.

El vermicompostaje es un proceso de compostaje especial, en el cual se utiliza especies de lombrices adecuadas. Dichas especies pertenecen al tipo ecológico de las epígeas y son definidas como aquellas que viven en la superficie del suelo, alimentándose de la materia orgánica que cae sobre dicha superficie (Card et al, 2004). La especie *Eisenia fetida* (Figura 2) es la especie mundialmente más utilizada para tratar residuos orgánicos de diversos orígenes (Hartenstein and Bisesi, 1989; Chan y Griffiths, 1988; Mitchell et al., 1980). La acción mecánica de este organismo acelera la tasa de descomposición de la materia orgánica mediante una vía de humificación (Hartenstein y Hartenstein, 1981).



Figura 2. Fotografía de ejemplares de la especie *Eisenia fetida*.

En la figura 3 se muestra un esquema comparativo entre un proceso tradicional de compostaje y uno de vermicompostaje.

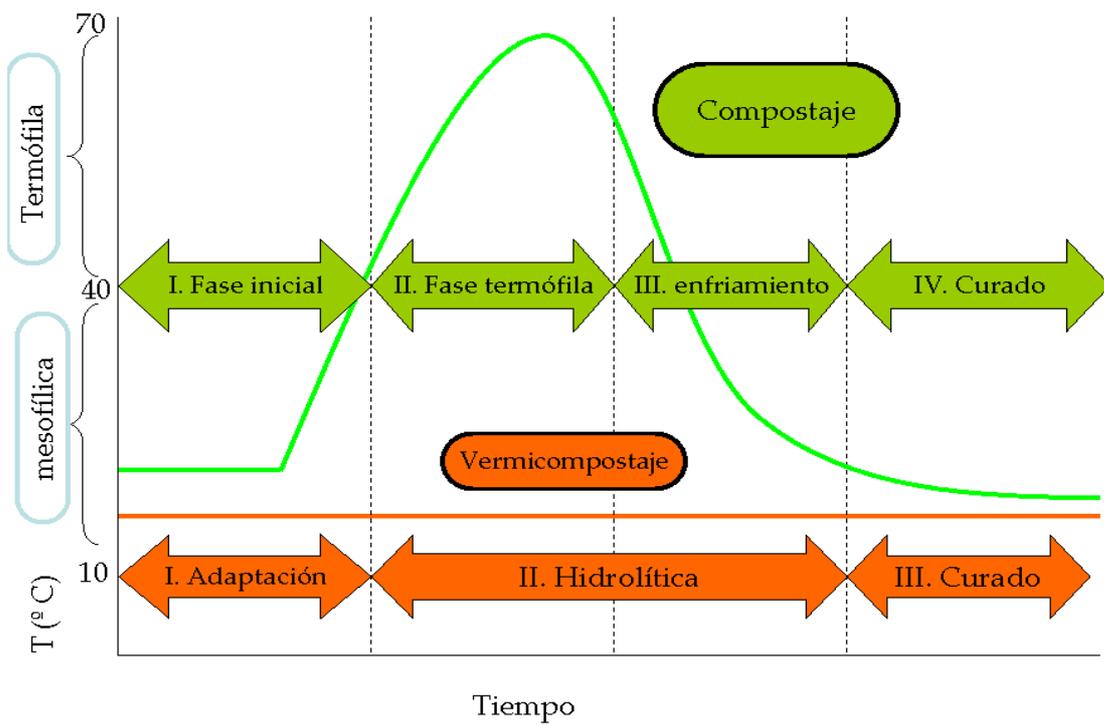


Figura 3. Esquema comparativo de las fases de los procesos de compostaje y vermicompostaje.

Como se puede apreciar en la figura el proceso de vermicompostaje se produce en todo momento a temperatura ambiente. En la fase inicial ocurre una adaptación de la población de lombrices al material orgánico que se le agregó. Esta fase incluye un período previo a la inoculación de la biomasa de lombrices en donde la materia orgánica deber haber experimentado una fase de colonización primaria de microorganismos descomponedores y poseer cierto grado de putrefacción.

Habiéndose alcanzado un nivel de microorganismos descomponedores, comienza la fase Hidrolítica en donde la acción conjunta lombriz-microorganismos, acelera la tasa de descomposición. Al cabo de unas pocas semanas o meses (dependiendo del material empleado), se observa una reducción del volumen de materia orgánica (por liberación de CO₂) y se observan los cambios fisicoquímicos mencionados que indican la culminación del proceso de descomposición.

Para la maduración final del producto o vermicompost, es necesario retirar la mayor cantidad posible de biomasa de lombrices, mediante diversos mecanismos. Por último se debe conducir el material al período final de maduración o curado, simplemente dejando al material a la intemperie o en determinados recipientes o envases en condiciones controladas (temperatura, humedad, etc).

En la figura 4 se esquematiza el proceso de digestión y el efecto causado sobre la biomasa microbiana (aumento de biomasa), se muestra también la estructura de las partículas eyectadas por los organismos (Worms cast) (Hartenstein y Hartenstein, 1981).

Existen tres tipos generales de sistemas de producción de vermicompostaje y estos son (figura 5):

*Camellones (windrows), cantero de unos 15 a 30 cm. de alto.

*Lechos (beds) canteros con contención

*Reactores en batch de flujo continuo (la biomasa de lombrices nunca se retira)

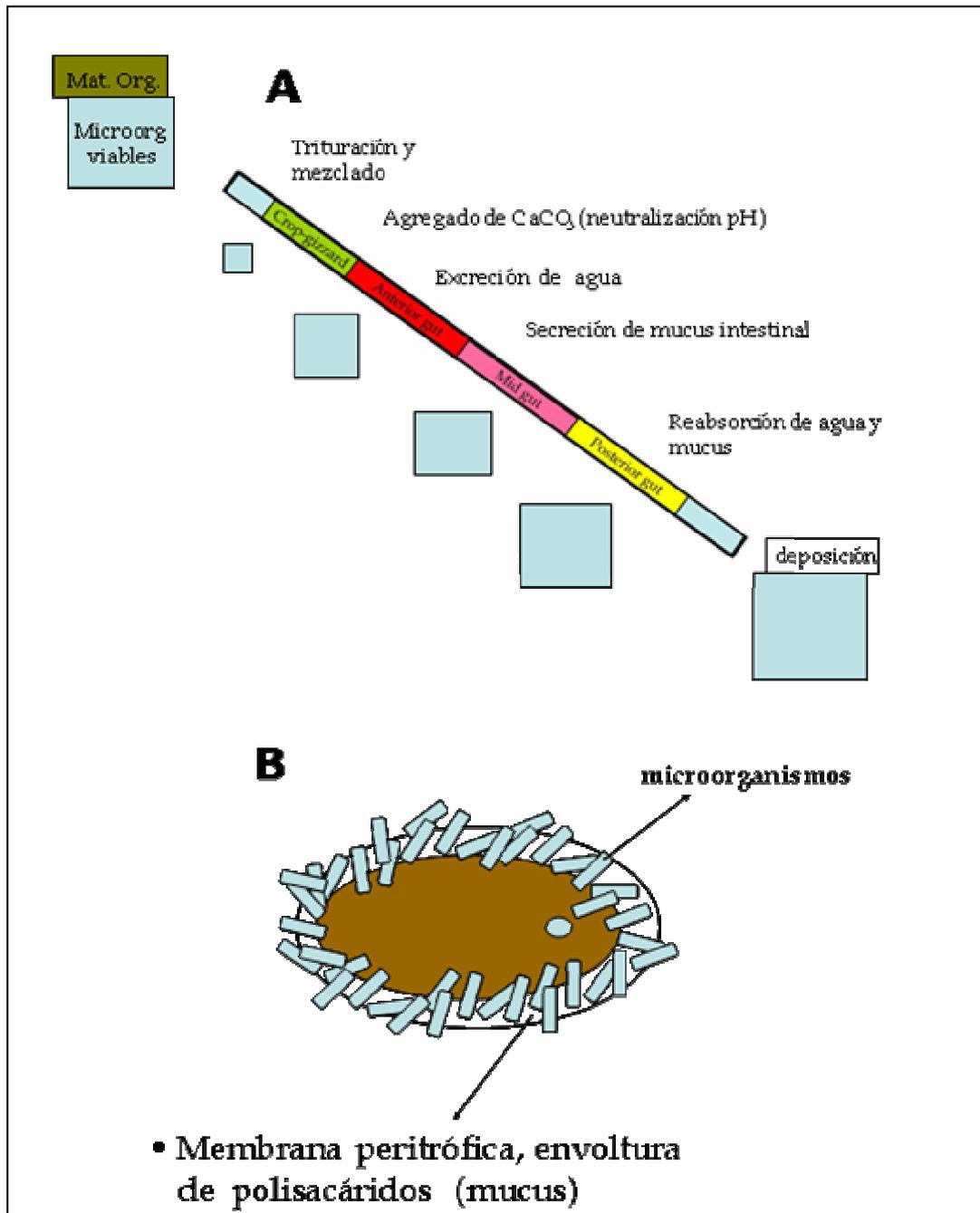


Figura 4. **A.** Esquema del proceso de digestión de la lombriz. **B.** Esquema de la estructura de la partícula eyectada (Hartenstein y Hartenstein, 1981)

La ventaja de este último sistema es que no es necesario retirar la biomasa de lombrices, ya que el producto se cosecha en la parte inferior del reactor y es agregado por la parte superior un igual volumen de alimento fresco. Este sistema está siendo empleado a gran escala para el vermicompostaje de lodos antropogénicos en Australia.

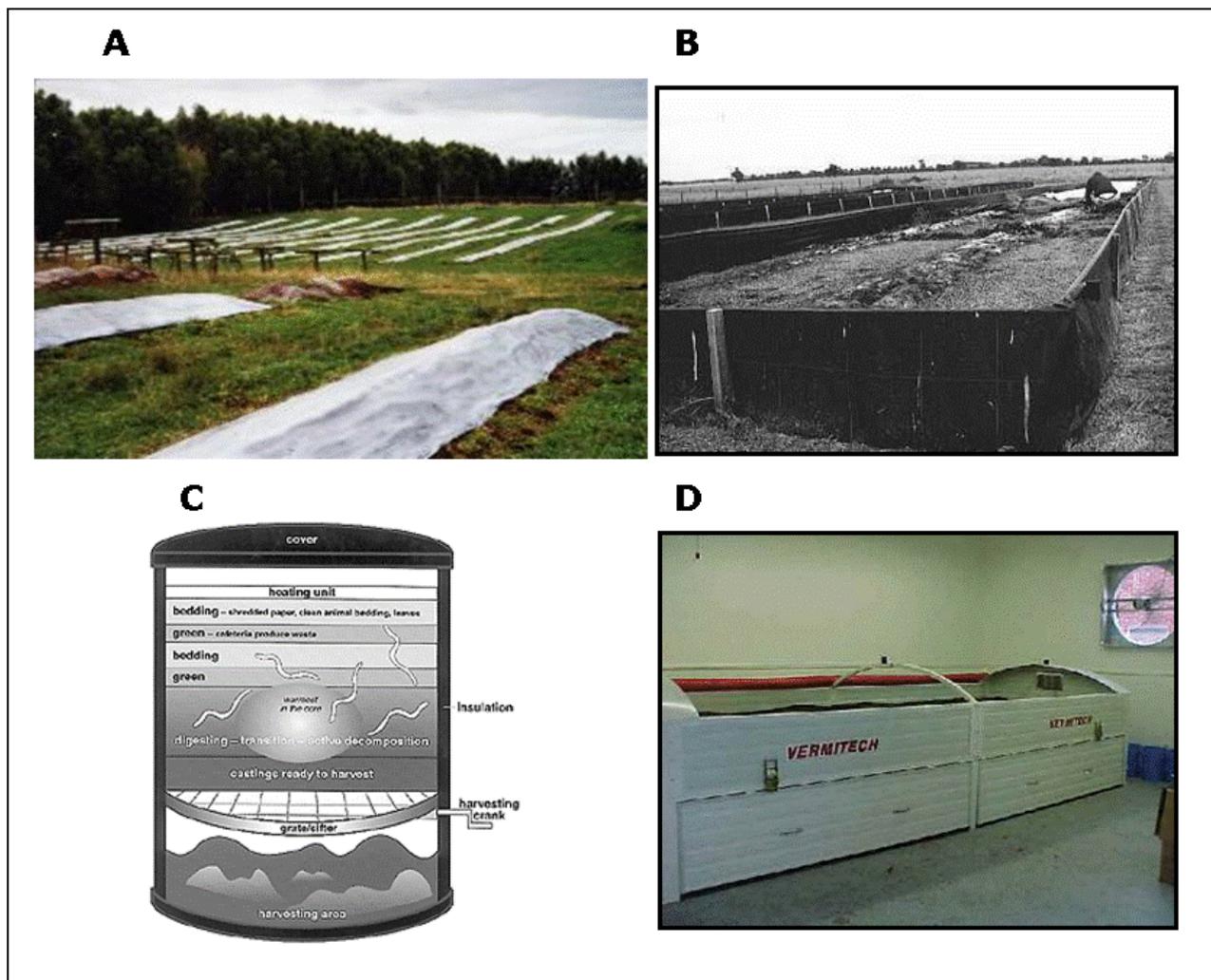


Figura 5. Sistemas de vermicompostaje. **A** Windrows (camellones) (www.groworm.co.nz). **B.** Beds (lechos, con contención) (www.journeytoforever.org/edu_compost.html). **C.** Esquema de reactor en batch a escala piloto de flujo continuo (www.vermico.com). **D.** Reactor de flujo continuo a escala industrial (www.vermitech.com).

3 Supresividad de fitopatologías en suelos y composts.

Un suelo o sustrato supresivo se define como aquel que no permite el desarrollo de un patógeno vegetal o la aparición de los síntomas asociados al mismo (Baker y Cook, 1974; Huber y Schneider, 1982).

La supresividad a los patógenos implica que todas o algunas de las fases de patogenicidad de los mismos han sido bloqueadas en dicho suelo supresivo o factores presentes en éste inciden sobre el huésped

activando sus mecanismos de defensa (resistencia inducida) (Cook y Baker, 1983).

En este tipo de suelos se destaca la importancia del ambiente (biótico y abiótico) sobre el patógeno y la expresión final de las enfermedades, siendo especialmente importante la disponibilidad de energía exógena, la que es proporcionada por los exudados vegetales, ya sea desde la semilla en germinación o de las raíces de plantas adultas (Garret, 1970). Dicha energía también es aportada por restos orgánicos que naturalmente se depositan sobre el suelo, pero estos también favorecen la actividad microbiana general, la cual interacciona y compite por dicha energía exógena evitando la patogenicidad.

El fenómeno de supresividad frente a diversas fitopatologías fúngicas asociados al uso de composts ha sido recurrentemente evaluado (Lumsden et al, 1983, Hoitink y Fahy, 1986; Chen et al., 1988; Mandelbaum et al, 1988).

Como se mencionó, este fenómeno de supresividad se debe a factores abióticos y bióticos. Entre los primeros encontramos los factores físicos como la capacidad de aireación, la cual está correlacionada con la granulometría del sustrato, habiéndose encontrado que para evitar la podredumbre de las raíces ocasionadas por *Phytophthora* en ciertas plantas como la azalea, es necesaria una aireación de al menos un 15% (Hoitink y Kuter, 1986). El aumento en la porosidad del sustrato donde la planta crece es por lo tanto importante para la supresión de aquellos hongos que poseen una multiplicación asexual y posterior dispersión de propágulos dependientes de la existencia de agua libre.

Sin embargo este factor físico no es aplicable para todos los tipos de compost a elaborar (Hoitink et al., 1987).

En cuanto a los factores químicos se encontró que la excesiva presencia de compuestos fenólicos, de ácidos grasos de cadena corta y baja presión parcial de oxígeno pueden suponer un estrés para la planta, llevándola a producir más exudados radicales aumentando de esta forma el potencial de inóculo del patógeno (Lockwood, 1988).

También se encontró que los niveles de nitrógeno presentes pueden afectar a los patógenos, habiéndose observado una mayor incidencia de *Fusarium oxysporum* cuando este nutriente presenta un valor alto (Hoitink et al., 1987).

Por otro lado se observó que a un bajo pH se inhibe la mayoría de las podredumbres de raíz inducidas por *Phytophthora*, habiéndose observado que un sustrato a base de compost de corteza de pino con un valor de pH de alrededor de 4,5 evitó la podredumbre de las raíces de *Aucuba japonica* por *Phytophthora cinnamoni* (Spencer y Benson, 1982). Este pH reduce la formación de esporangios y la liberación y motilidad de las zoosporas.

Se demostró que existe, para algunos composts supresivos, la presencia de sustancias inhibitoras con acción fungicida. Una de las sustancias más tóxicas que fueron encontradas en los extractos acuosos de los composts de cortezas de árboles frondosos de menos de seis meses de maduración, se identificaron como etil-ésteres de ácidos hidroxi-oleicos (Hoitink y Kuter, 1985). También existen otras sustancias tóxicas de naturaleza fenólica como los taninos y ácidos fenólicos (Solbraa, 1986).

La gran mayoría de los estudios realizados se han centrado en las interacciones entre microorganismos antagonistas y la materia orgánica de los sustratos (Hoitink y Fahy, 1986). Varios hechos indican que la causa de la mayoría de los fenómenos de supresividad asociados a los composts se debe a factores biológicos. Una de las primeras evidencias de esto surgió cuando se demostró que la desinfección de los composts por calor anula la supresión (Chef et al., 1983), observándose también que muestras tomadas del centro de una pila de compostaje (a temperaturas superiores a los 55°C no son supresivos, pero la adición de pequeñas cantidades de compost del borde de la pila provocan una conversión hacia la supresividad (Kuter et al., 1983).

Se han descrito tres mecanismos principales de control biológico asociados a los composts frente a enfermedades de origen edáfico y estos son: la supresión “general” (fungistasis o microbiostasis), la inducción de resistencia en la planta y por último la supresión

“específica” (parasitismo microbiano). La fungistasis es una interacción por los nutrientes y por lo tanto son muchas las especies microbianas implicadas (Lockwood, 1988), siendo las principales responsables aquellas con ciertas características que las hacen colonizadoras predominantes en la rizósfera, como es el caso de las *Pseudomonas* spp. (Wu et al., 1993).

La utilización rápida de los nutrientes y de los exudados radicales por parte de la microflora antagonista inhibe la germinación de las esporas de los patógenos como por ejemplo los de *Phytophthora* y *Pythium* (Lynch y Whipps, 1990). Craft y Nelson (1996), demostraron que la actividad microbiana medida por hidrólisis de FDA (diacetato de fluoresceína) tenía una correlación directa con la supresión del damping-off causado por *Pythium ultimum* y *P. graminicola* para el caso de ciertos tipos de composts. Chen et al., (1988), postularon que la hidrólisis de FDA junto con la biomasa microbiana podían ser utilizados como parámetros predictivos de la supresividad a éstos patógenos, postulando que la supresión era del tipo “general” y el mecanismo de biocontrol está ligado a una competencia por nutrientes. En definitiva este es un fenómeno determinado por la capacidad de mantenimiento microbiano del medio, siendo la liberación lenta de los nutrientes orgánicos como los carbohidratos poliméricos inmovilizados en los composts maduros, lo que sustenta la actividad de la microflora y así se mantiene el biocontrol que da lugar a la mencionada supresión general (Avilés y Tello, 1995). El nivel de descomposición de la materia orgánica del compost es quien determina su capacidad de mantenimiento microbiano (Chen et al., 1988). En la figura 6 se esquematiza un mecanismo de biocontrol por consumo de ácido linoleico por parte de *Enterobacter cloacae*, se postula que este compuesto es uno de los responsables de la germinación de las zoosporas de *Pythium* (McKellar y Nelson, 2003).

Como se mencionó también se encontró el mecanismo de inducción de resistencia vegetal, encontrándose que los composts a base de cortezas

de abeto y pino indujeron resistencia en plantas de pepino frente a la podredumbre de raíz y cuello producidas por *Pythium ultimum* y

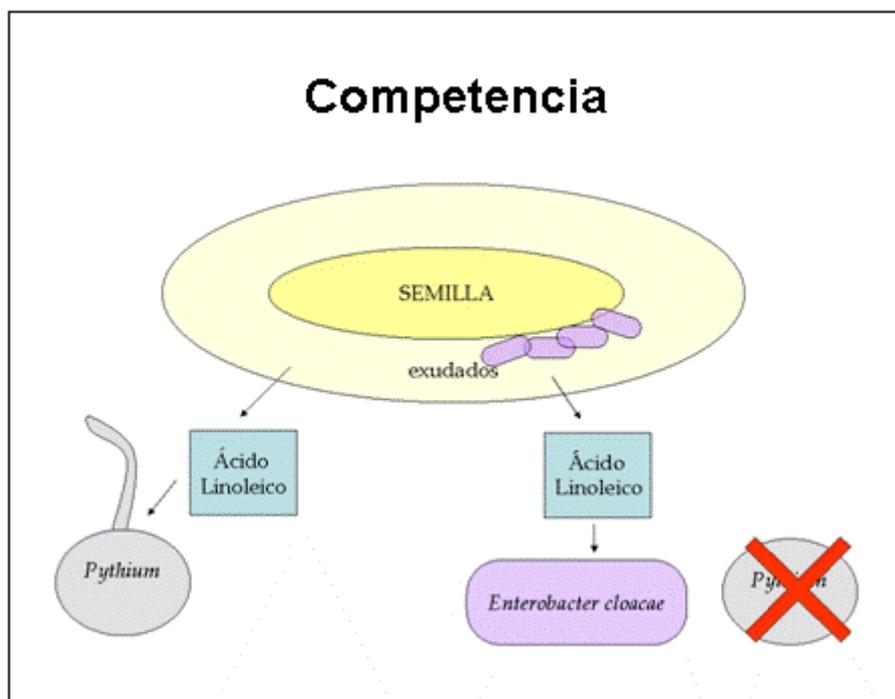


Figura 6. Esquema de un mecanismo de competencia por moléculas inductoras de la germinación de esporas de *Pythium* sp. (McKellar y Nelson, 2003)

Pythium aphanidermatum (Zhang et al., 1996). También se demostró que la aplicación foliar de extractos acuosos derivados de composts inducen resistencia en las plantas y esto se debió tanto a microorganismos presentes como a compuestos químicos no identificados (Zhang et al., 1998). En la figura 7 se muestra un ejemplo en dónde una cepa de *Pseudomonas corrugata* induce la resistencia sistémica frente a *Pythium* (Chen et al., 2000)

El mecanismo para el control biológico de fitopatógenos tales como *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* es totalmente diferente al que suprime a *Pythium* y *Phytophthora*, en este caso tiene lugar una supresión “específica”. Tanto *Rhizoctonia solani* como *Sclerotium rolfsii* producen grandes propágulos nutrientes no dependientes conocidos como esclerotos, lo que los hace poco vulnerables a la fungistasis

(Lockwood, 1988). La supresividad a estos patógenos esta asociada a la presencia de un grupo reducido de microorganismos fúngicos (como *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* sp.) (Kuter et al., 1983) y bacterianos (como *Flavobacterium* sp., *Xanthomonas maltophilia* y *Bacillus* spp.) (Hoitink y Fahy, 1986). Todos estos grupos son colonizadores primarios de la materia orgánica.

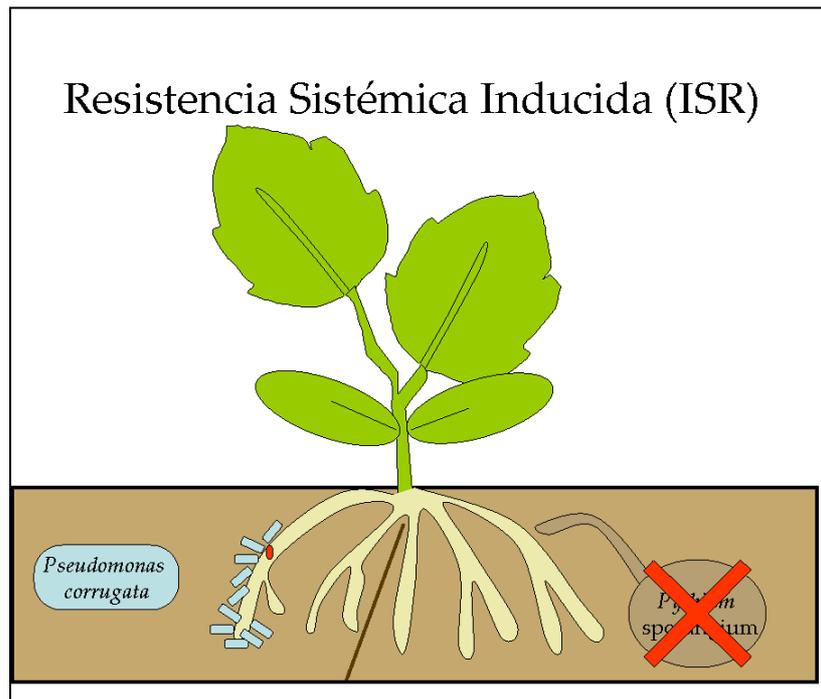


Figura 7. Esquema de ejemplo de mecanismo de biocontrol a través de la Resistencia Sistémica Inducida (ISR) (Chen et al., 2000)

Para el caso de *Xanthomonas*, *Bacillus* y también las *Pseudomonas* como *P. fluorescens* entre otras, el mecanismo de acción es a través de compuestos antifúngicos como antibióticos, sideróforos (que compiten por trazas de hierro) y enzimas que hidrolizan la pared celular (quitinasas) (Tomashow et al., 1990, Rosales et al., 1995, Zhang and Yuen, 2000, Jakobi et al., 1996). En la figura 8 se esquematiza el mecanismo de antibiosis de una cepa de *Bacillus subtilis* que produce

dos antibióticos (iturina A y surfactina) capaces de controlar a *R. solani* en almácigos de plántulas de tomate (Asaka y Shoda, 1996).

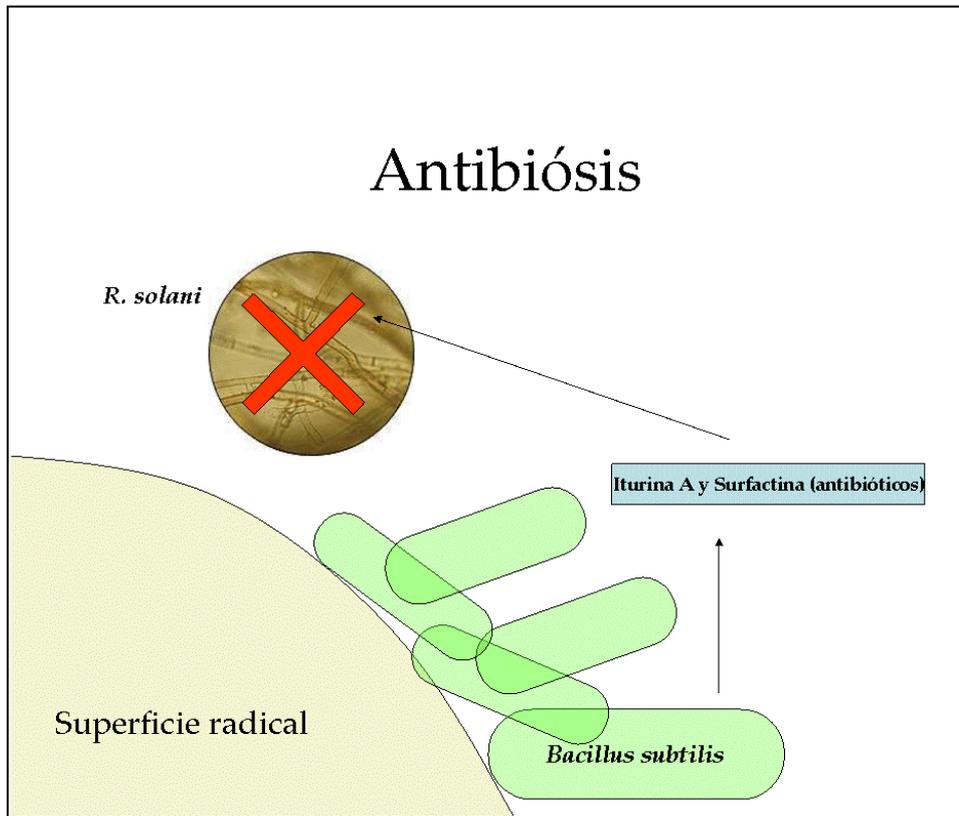


Figura 8. Esquema de biocontrol de *R. solani* por antibiósisis (Asaka y Shoda, 1996).

En la figura 9 se muestra una fotografía en la que *Trichoderma* se encuentra parasitando hifas de *Pythium*.

Se han aislado hongos micoparásitos a partir de esclerotos introducidos en compost de orujo de uva como *Penicilium* spp, *Fusarium* spp, habiéndose encontrado en este caso muy bajas poblaciones de *Trichoderma*, concluyéndose que los micoparásitos predominantes pueden variar según el tipo de compost (Hadar y Gorodecki, 1991).

Para el caso de la supresión "específica" los mencionados propágulos son más rápidamente erradicados comparados con la "general" (Nelson et al., 1983).

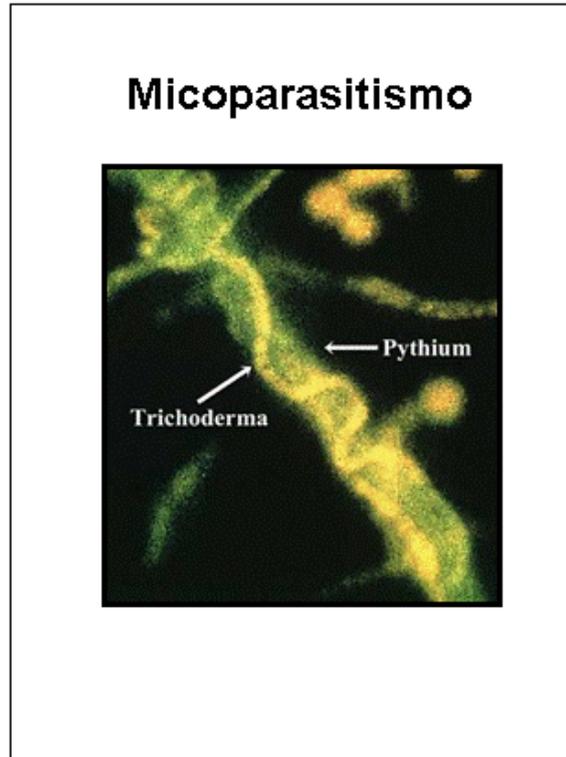


Figura 9. Fotografía que muestra como *Trichoderma* parasita hifas de *Pythium* (www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma).

Otros estudios también demostraron que el contenido de celulosa en un compost afecta la supresividad a *R.solani*, donde a pesar de existir una microflora supresiva, la presencia de celulosa lo hace conductivo al patógeno (Chung et al, 1988).

Este comportamiento se justifica porque *Rhizoctonia solani* es muy competitivo como saprófito y dado que al poder metabolizar la celulosa coloniza rápidamente los compost ricos en éste compuesto incrementándose su potencial de inóculo. Dado que se puede producir transitoriamente una alta concentración de glucosa, esta reprime la expresión de enzimas antifúngicas como las quitinasas producidas por *Trichoderma* (Elad et al., 1982) y la síntesis bacteriana de antibióticos (Hoitink et al., 1993).

Posteriormente, se observó que la adición de celulosa en un compost (obtenido a partir de restos de frutas, hortalizas y restos de poda) con un período de maduración o de curado prolongado (de alrededor de 7

meses), por el contrario provocaba un aumento en la supresividad a *R. solani*, correlacionándose con el aumento durante este período de la abundancia de microorganismos celulolíticos y oligotróficos. (Tuitert et al., 1998).

Dado la especificidad en el control biológico de estos patógenos se encontró una alta variabilidad en la supresividad de diferentes lotes de un compost, y esto se explicó debido a la recolonización aleatoria posterior a la fase termófila, demostrándose que los compost elaborados a campo (al aire libre) tienen una supresividad más consistente que los producidos en condiciones de resguardo (Hoitink y Fahy, 1986).

Se ha demostrado que ciertas especies de lombrices están correlacionadas con una disminución significativa en la incidencia de fitopatologías, como el caso de la supresión de *Rhizoctonia solani* en plántulas de trigo (Stephens et al., 1993a), y del take-all en trigo causado por *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* (Clapperton et al., 2001).

Los mecanismos por los que se produce este efecto pueden ser variados. Se ha reportado que las lombrices pueden actuar como agentes de transporte y dispersión de microorganismos biocontroladores. El trabajo de Stephens et al., 1993b demostró que la cepa biocontroladora *Pseudomonas corrugata* (cepa 2140R) era transportada por la acción de las lombrices desde una fuente de inóculo colocada superficialmente en el suelo, hacia zonas más profundas del mismo y hacia las raíces de plantas de trigo. Este mismo fenómeno de transporte fue obtenido para otros géneros y especies de la misma familia (*Lumbricidae*) como: *Aporrectodea caliginosa*, *A. longa*, *Lumbricus rubellus* y *L. terrestris*.

Se demostró también que en las deposiciones de éstas especies de lombrices se obtiene un elevado número del agente de biocontrol (Schmidt et al., 1997). Trabajos de Daniel y Anderson, 1992 mostraron que la especie *L. rubellus* aumenta la tasa de producción microbiana de CO₂ así como el número de bacterias totales luego del pasaje de suelo por su intestino.

Dado que el efecto supresor de las lombrices sobre diversos patógenos esta probablemente mediado por la acción de la microflora asociada a las deposiciones de las mismas (casts), el uso directo de los vermicomposts puede tener el mismo impacto sobre dichos patógenos (Stephens et al., 1999).

Como se mencionará en el capítulo 2, la supresividad mediada por vermicompost a patógenos como *Rhizoctonia solani* ya ha sido reportada (Chaoui et al., 2002).

Por otro lado como se discutirá en el capítulo 1, se ha reportado una serie de estudios que demuestran que el efecto de promoción de crecimiento vegetal causado por el agregado de vermicomposts, se debe a la presencia en éstos de grupos microbianos benéficos y actividades microbianas que favorecen dicho crecimiento vegetal.

Dado que el efecto de supresividad y la promoción de crecimiento vegetal de los materiales compostados esta correlacionada con la composición y estructura de sus comunidades microbianas, es de utilidad encontrar métodos adecuados para el estudio de estas, lo que permitiría determinar la calidad biológica de estos productos. Esta correlación es fundamental para entender el efecto de las enmiendas en la producción agrícola.

4 Estudio de las comunidades microbianas complejas

En los últimos años se han desarrollado técnicas de estudio de comunidades microbianas cultivo independientes, dado que se ha demostrado que mediante un aislamiento *in vitro* de los microorganismos edáficos, solo se logra observar menos del 1% de la diversidad total presente (Bakken, 1985; Richaume et al, 1993), estas técnicas han permitido ampliar el espectro del conocimiento de dichas comunidades. Dentro de éstas las más recientes son las que utilizan ácidos nucleicos. En particular, la técnica de T-RFLP (Terminal restriction fragment

length polymorphism), consiste en purificar el ADN de la muestra, amplificar por PCR los genes ARNr 16S utilizando el cebador 5' primario marcado con un fluoróforo, los productos de PCR (mezcla de los genes del ARNr de 16S de la comunidad bacteriana) se cortan con enzimas de restricción específicas y se separan mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático. Se obtiene un cromatograma donde cada pico representa un fragmento de tamaño determinado (se asume que diferentes especies presentan diferentes tamaño de fragmento) y la intensidad de fluorescencia depende de la abundancia de ese microorganismo en la muestra. Como se mencionará en el capítulo 1, éste método constituye una herramienta versátil para el estudio de la estructura de las comunidades microbianas de muestras edáficas (Dunbar et al, 2000; Tiquia et al 2002; Pérez-Piqueres et al, 2006; Benítez et al, 2007).

Dado que varias especies microbianas pueden presentar el mismo sitio de corte para la endonucleasa, la biodiversidad presente también es subestimada, por lo cual el uso de otros métodos como el de construcción de librerías genómicas a través del clonado de secuencias del ARNr 16S, puede ser útil para ampliar el rango de análisis de dicha diversidad (Dunbar et al., 1999, Dunbar et al. 2000). Ésta metodología permite conocer la identidad de los microorganismos mediante un análisis filogenético de las secuencias. Otras de las ventajas es que permite determinar una relación mediante análisis de restricción *in silico* (para la endonucleasa utilizada en T-RFLP) con los fragmentos de restricción terminales (T-RFs) observados.

5 Bibliografía

- Atiyeh, R.M., Arancon, N., Edwards, C.A., Metzger, J.D.** 2000. Influence of earthworm processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. *Biores. Technol.* 75. 175-180.
- Asaka, O., Shoda M.** 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *App. Env. Microbiol.* 62. 4081-4085.
- Avilés, M., Tello, J.** 1995. El compostado de los residuos orgánicos. Su relación con las enfermedades de las plantas. En "Agroecología y Desarrollo". Ediciones Mundi-Prensa. Universidad de Extremadura. 185-215.
- Bagstam, G.** 1978. Population changes in microorganisms during composting of spruce-bark. I. Influence of temperature control. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5. 315-330.
- Baker, K.F., Cook, R.J.** 1974. Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman. San Francisco.
- Bakken, L.** 1985. Separation and purification of bacteria from soil. *App. and Env. Microbiol.* 49, 1482-1487.
- Benítez, M.S., Tustas, F.B., Rotenberg, D., Kleinhenz, M.D., Cardina, J., Stinner, D., Miller, S.A., McSpadden, G.** 2007. Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. *Soil Biol. Biochem.* 39. 2289-2301
- Card, A.B., Anderson, J., Davis, J.G.** 2004. Vermicomposting horse manure. Colorado State University Cooperative Extension no. 1224. <http://www.ext.colosate.edu/pubs/livestk/01224.html>.
- Chan, P.L.S., Griffiths, D.A.** 1988. The vermicomposting of pretreated pig manure. *Biol. Wastes.* 24. 57-69.
- Chang, Y., Hudson, H.J.** 1967. The fungi of wheat straw compost. II. Biochemical and physiological studies. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 50. 113-119.

- Chaoui, H., Edwards, C.A., Brickner M.** 2002. Suppression of the plant diseases, *Pythium* (damping-off), *Rhizoctonia* (root rot) and *Verticillium* (wilt) by vermicomposts. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference Pest and Diseases. Vol. II 8B-3: 711-716.
- Chef, D.G., Hoitink. H.A., Madden, L.V.** 1983. Effect of organic components in container media on suppression of *Fusarium* wilt of chrysanthemum and flax. *Phytopatol.* 73. 279-281.
- Chen, W., Hoitink. H.A., Madden, L.V.** 1988. Microbial activity and biomass in container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopatol.* 78. 1447-1450.
- Chen, C., Bélanger R., Benhamou, N., Paulitz, T.C.** 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant-growth-promoting rhizobacterias (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathool.* 56. 13-23.
- Chung, Y. R., Hoitink, H., Lipps, P.E.** 1988. Interactions between organic-matter decomposition level and cellulose amendment on the inoculum potential of *Rhizoctonia solani* in hardwood bark media. *Phytopatol.* 80. 73-77
- Clapperton, M., Lee, N., Binet, F., Conner, R.** 2001. Earhworms indirectly reduce the effects of take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) on soft winter spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Fielder. *Soil. Biol. and Biochem.* 33, 1531-1538
- Cook, R.J and Baker, K.F.** 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Third printing Ed. APS Press. St. Paul. Minesota.
- Cooney, D.G., Emerson, R.** 1964. Thermophilic fungi. An account of their biology activities and classification. W.A. Freeman and Company. San Francisco.
- Craft, C.M., Nelson, E.B.** 1996. Microbial properties of composts that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62.1550-1557.
- Daniel, O., Anderson, J.M.** 1992. Microbial biomass and activity in contrasting soil materials after passage through the gut of the

- earthworm *Lumbricus rubellus* Hoffmaster. Soil. Biol. and Biochem. 24. 5. 465-470.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., Kuske, C.R.** 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. App. Env. Microbiol. 65. 1662-1669.
- Dunbar, J., Lawrence, O., Kuske, C.** 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene Terminal Restriction Fragment Analysis. App. and Env. Microbiol. 66 (7), 2943-2950.
- Elad, Y., Chet, I., Henis, Y.** 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 28. 719-725.
- Garret, S.D.** 1970. Pathogenic root –infecting fungi. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Goleuke, C.G.** 1972. Composting: A study of the process and its principles. Rodade Press.Emmaus. Pen.
- Hadar, Y., Gorodecki, B.** 1991. Suppression of germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in compost. Soil Biol. Biochem. 23. 303-306.
- Hameeda, B., Rupela, O.P., Reddy, G., Satyavani, K.** 2006. Application of plant growth promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Peral Mollet (*Pennisetum glaucum* L.) Biol. Fertil. Soils. 43. 221-227.
- Hartenstein, R., Hartenstein, F.** 1981. Physicochemical changes in acvtivated sludge by the earthworm *Eisenia foetida*. J. Environ. Qual. 10. 377-382.
- Hartenstein, R., Bisesi, M.S.** 1989. Use of earthworms biotechnology for the management of effluents from intensively housed livestock. Outlook Agric.18. 3-7.
- Henry, C.L., Harrison, R.B.** 1996. Carbon fractions in compost and compost maturity test. Soil organic matter: Analysis and interpretation. Soil Science Society of America. 46. SSSA Inc. Madison, Wisconsin.
- Hoitink, H.A.** 1980. Composted bark, a lightweight growth medium with fungicidal properties. Plant Disease. 64. 142-147.

- Hoitink, H.A., Boehm, M.J., Hadar, Y.** 1993. Mechanisms of suppression of soilborne plant pathogens in compost amended substrates. Science and engineering of composting. Renaissance Publications. Worthington. 601-621.
- Hoitink, H.A., Daugherty, M., Tayama, H.K.** 1987. Control of cyclamen Fusarium wilt. A preliminary report. Ohio Florist Assoc. Bull. 693, 1-3.
- Hoitink, H. and Fahy, P.** 1986. Basis for the control of soil-borne plant pathogens with composts. Ann. Rev. Phytopathol. 24. 93-114.
- Hoitink, H.A., and Kuter, G.A.** 1985. Effects of composts in container media on diseases caused by soilborne plant pathogens. Acta Horticulturae. 172. 191-196.
- Hoitink, H.A., and Kuter, G.A.** 1986. Effects of composts in growth media on soilborne pathogens. The role of organic matter in modern agriculture. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands. 289-306.
- Huber, D.M., Schneider, R.W.** 1982. The description and occurrence of suppressive soils. "Suppressive soil and plant disease". APS Press. St. Paul. Minnesota. 1-7.
- Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., Kempter, C., Jung, G., Berg, G., Bahl, H.** 1996. Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R 3089. The Journal of Antibiotics. 49. 1101-1104.
- Kuter, G.A., Nelson, E.B. Hoitink, H.A., Madden. L.V.** 1983. Fungal populations in container media amended with composted hardwood bark suppressive and conducive to *Rhizoctonia* damping-off. Phytopathol. 73. 1450-1456.
- Lynch, J.M., Whipps, J.M.** 1990. Substrate flow in the rhizosphere. Plant Soil. 129. 1-10.
- Lockwood, J.L.** 1988. Evolution of concept associated with soilborne plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 26. 93-121.
- Lumsden, R.D., Lewis, J.A., Millner, P.D.** 1983. Effects of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. Phytopathol. 73. 1543-1548.

- Mandelbaum., R., Hadar, Y., Chen, Y.** 1988. Effect of heat treatment on suppression of *Pythium pahanidermatum* and microbial activities in substrates containing compost. Biol. Wastes.26. 261-274.
- McKellar, M.E., Nelson, E.B.** 2003. Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed colonizing microbial communities. App. Env. Microbiol. 69. 452-460.
- Mitchell, M.J., Hornor, S.G., Abrams., B.I.** 1980. Decomposition of sewage sludge in drying beds and the potential role of the earthworm *Eisenia foetida*. J. Environ. Qual. 9. 373-378.
- Nelson, E.B., Kuter, G.A., . Hoitink, H.A.** 1983. Effects of fungal antagonist and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. Phytopatol. 73. 1457-1462.
- Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C.** 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. Soil Biol. Biochem. 38.460-470.
- Poincelot, R.P.** 1972. The biochemistry and methodology of composting. Bulletin 727. Conn. Agric. Exp. Stn.
- Solbraa, K.** 1986. Bark as a growth media. Acta Horticulturae. 178. 129-165.
- Richaume, A., Steinberg, C., Jocteur-Monrozier, I. Faurie, G.** 1993. Differences between direct and indirect enumeration of soil bacteria: the influence of soil structure and cell location. Soil. Biol. and Biochem. 25, 611-643.
- Rosales, A., Thomashow, L., Cook, R., Mew. T.** 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice associated antagonistic *Pseudomonas spp.* Phytopatol. 85. 1028-1032.
- Schmidt, O., Doube, M., Ryder, M.H., Killham, K.** 1997. Population dynamics of *Pseudomonas corrugata* 2140R *Lux8* earthworm food and in earthworm casts. Soil. Biol. and Biochem.29. 523-528.
- Spencer, S, Benson, D.M.** 1982. Pine bark., hardwood bark compost, and peat amendment effects on development of *Phytophthora spp.* and lupine root rot. Phytopatol. 72. 346-351.

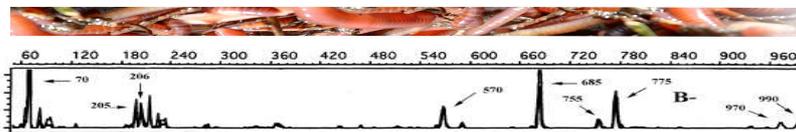
- Stephens, P., Davoren, C., Doube, B., Ryder, M., Benger, A., Neate, S.** 1993 (a). Reduced Severity of *Rhizoctonia solani* disease on wheat seedlings associated with the presence of the earthworm *Aporroctodea trapezoides* (Lumbricidae). Soil. Biol. and Biochem. 25. 11. 1477-1484.
- Stephens, P., Davoren, C.W., Ryder, M.H., Doube, B.M.** 1993 (b). Influence of the Lumbricid earthworm *Aporroctodea trapezoides* on the colonization of wheat roots by *Pseudomonas corrugata* strain 2140R in soil. Soil Biol. Biochem. 25. 12. 1719-1724.
- Stephens, P., Kruger, H., Dullahide, S.** 1999. Ability of vermicompost to reduce the impact of withe root rot in apples and clubroot in broccoli. First Australian Soil-borne Disease Symposium. Gold Coast. Australia.
- Stevenson, F.J.** 1982. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. Wiley, New York.
- Thomashow, L.S. Weller, D.M., Bonsall, R.F., Pierson, L.S.** 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. App. Env. Microbiol. 56. 908-912.
- Tiquia, M., Lloyd, J., Herms, D., Hoitink, H., and Michel, F.** 2002. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of T-RFLPs of PCR -amplified 16S rRNA genes. App. Soil Ecol.21. 31-48.
- Tuitert, G., Szczech, M., Bollen, G.J.** 1998. Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with composts made from organic household waste. Phytopatol. 88. 764-773.
- Wu, T., Bohem, M.J., Madden L.V., Hoitink, H.A.** 1993. Sustained suppression of *Pythium* root rot: a function of microbial carrying capacity and bacterial species composition. Phytopatol.83. 1365.
- Zhang, W., Han, D.Y., Dick, W.A., Davis, K.R., Hoitink, H.A.** 1998. Compost and compost water extract induced systemic acquired resistance in cucumber and *Arabidopsis*. Phytoapatol. 88. 450-455.

Zhang, W., Hoitink, H.A, Dick, W.A. 1996. Compost induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. *Phytopatol.* 86. 1066-1070.

Zhang, Z., Yuen, G.Y. 2000. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopatol.* 90. 384-389.



Objetivos y estrategia experimental



Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue determinar si existe una correlación entre las comunidades bacterianas de diferentes vermicompost y las propiedades de promoción de crecimiento vegetal y supresividad a fitopatógenos de dichos vermicomposts en su uso como enmiendas para suelo y como sustratos para plántulas.

Objetivos específicos

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Estudiar el efecto de la incorporación de diversos vermicomposts sobre la comunidad bacteriana del suelo y determinar la correlación entre cambios en la estructura de la comunidad y el rendimiento productivo.

Estudiar el efecto de supresión al mal de almácigos (damping-off) causado por *Rhizoctonia solani* por el agregado de diferentes vermicompost y determinar la relación entre la estructura de la comunidad bacteriana y la capacidad de supresión.

Correlacionar la capacidad de promoción de crecimiento y de supresión de fitopatógenos con la presencia de microorganismos que puedan explicar estos efectos.

Estrategia experimental

Para cumplir con estos objetivos se realizaron dos series de ensayos utilizando vermicompost obtenidos a partir de distintos materiales orgánicos de desecho y con diferentes sistemas de producción.

En un primer ensayo (capítulo 1) se estudió el efecto de la incorporación de diferentes vermicompost a suelo de invernáculo cultivado con plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) sobre las siguientes variables: los parámetros agronómicos de las plantas (altura máxima alcanzada, número de frutos y peso total de frutos cosechados por planta), la comunidad bacteriana y la actividad microbiana del suelo medida por hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA). Se buscó correlacionar los efectos observados sobre los rendimientos productivos con las demás variables analizadas y con la presencia de microorganismos promotores del crecimiento.

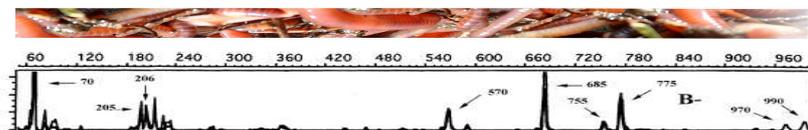
En un segundo ensayo (capítulo 2) se estudió la capacidad de supresión del mal de almácigos causado por *Rhizoctonia solani* en plántulas de tomate por el agregado de diferentes vermicompost en sustratos en base a ceniza de cáscara de arroz. Se estudió la comunidad microbiana de los diferentes sustratos y se buscó correlacionar la comunidad microbiana de los sustratos supresivos con la presencia de microorganismos biocontroladores.

En ambos ensayos se estudió la comunidad microbiana mediante análisis de T-RFLP del gen del ARNr de 16S. Se realizaron análisis multivariados para relacionar la estructura de la comunidad microbiana con los diferentes efectos. Se buscó identificar los microorganismos predominantes relacionando los picos del T-RFLP con secuencias del gen del ARNr de 16S obtenidas en bases de datos y a partir de una biblioteca de clones construida a partir de uno de los vermicompost.



Capitulo1

Efectos del agregado de vermicomposts a suelo de invernáculo. Estudio sobre: la comunidad bacteriana, la actividad microbiana del suelo y la producción de tomates



Efectos del agregado de vermicomposts a suelo de invernáculo. Estudio sobre: la comunidad bacteriana, la actividad microbiana del suelo y la producción de tomates

1 Resumen

En el presente trabajo se analizan los efectos de la incorporación de diferentes vermicomposts a suelo previamente tratado con insecticida Carbofurán, estudiando en forma conjunta las siguientes variables: la comunidad bacteriana, la actividad microbiana y la productividad de un cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Dominique). La actividad microbiana estudiada por hidrólisis de FDA mostró que los vermicomposts con menor periodo de curado, provocaron un aumento significativo en ésta, observándose una correlación no lineal inversa con el peso total de frutos cosechados, indicando un posible efecto de inmovilización de nutrientes causado por los microorganismos. Las enmiendas también provocaron una modificación en la comunidad bacteriana del suelo de acuerdo al análisis de agrupamiento (cluster) y de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos por T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms) del gen ARNr 16S. Se observó además un aumento en la abundancia relativa de algunos fragmentos de restricción terminales (T-RFs). Éstos se correlacionaron con T-RFs correspondientes para géneros con propiedades promotoras del crecimiento vegetal como: *Pseudomonas* y *Pantoea*. Los análisis multivariados revelaron que la estructura de la comunidad bacteriana del suelo sin aplicación de Carbofurán ni vermicomposts (SFV), presentó mayor similitud con las de suelo con enmiendas que con las de suelo tratado con pesticida y sin enmiendas, sugiriendo que la aplicación de dichas enmiendas podría restaurar el efecto perturbador del pesticida. En uno de los tratamientos en que se agregó vermicompost (FVCP) se observó un incremento significativo en el peso promedio de los frutos cosechados. Éste aumento se puede relacionar con un incremento de la abundancia de ciertos microorganismos en el suelo que promueven el crecimiento vegetal, conjuntamente con un aporte adecuado de nutrientes.

Estos resultados muestran que no solo se debe tener en cuenta los parámetros físicos y químicos como indicadores de calidad de las enmiendas, sino también a los parámetros biológicos.

Palabras clave: T-RFLP ARNr 16S, hidrólisis de FDA, *Pseudomonas*, *Pantoea*

2 Introducción

El suelo es un sistema dinámico integrado por minerales, materia orgánica y organismos vivos, la interacción entre estas partes determina la productividad del mismo.

Las prácticas convencionales (monocultivo, fertilización química, pesticidas, etc.) producen una reducción en la diversidad biológica de la biota edáfica, en general, y de los microorganismos de suelo, en particular; lo que puede ocasionar una pérdida de grupos capaces de favorecer el desarrollo vegetal (Matson et al., 1997; Altieri, 1999).

Es sabido que la aplicación de compost y vermicompost (los cuales se obtienen por la descomposición de desechos orgánicos por un proceso termófilo en el primer caso y mediado por la acción de lombrices de la especie *Eisenia fetida* en el segundo caso) al suelo, produce un efecto favorable para el desarrollo vegetal, proporcionando macro y micronutrientes en forma disponible (Orozco et al., 1996; Chaoui et al., 2003). También se ha demostrado que provoca aumento en la biomasa y en la actividad microbiana (Sánchez-Monedero et al., 2008). Además modifica la estructura de la comunidad bacteriana, estimulando el aumento de grupos bacterianos de acción favorable, que logran disminuir el impacto de fitopatógenos (hongos, nematodos, etc.) (de Brito Alvarez et al., 1995; Hoitink y Fahy, 1986; Chaoui et al., 2002). Estos efectos en la comunidad, varían según la materia prima utilizada para su elaboración, el período de curado (tiempo transcurrido luego de ser cosechado el compost) y la dosis de aplicación (Bohem et al., 1993, Perez-Piquerez et al., 2006).

El método de Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms (T-RFLP) del gen del ARNr de 16S, fue desarrollado para el análisis (cultivo no dependiente) de comunidades bacterianas de muestras ambientales, y mostró ser adecuado y reproducible para las de origen edáfico (Dunbar et al., 2000). Esta técnica, detecta cambios en la

comunidad microbiana y constituye una herramienta útil para el monitoreo del impacto en el suelo causado por una determinada práctica agrícola (Tiquia et al., 2002). Los datos experimentales resultantes del T-RFLP, pueden ser procesados por análisis estadísticos multivariados como el análisis de componentes principales (PCA) y de agrupamiento (cluster). Se demostró que estos son útiles como métodos de ordenación y diferenciación debido a cambios en la abundancia de grupos microbianos predominantes según los diferentes tratamientos efectuados en el suelo (Pérez-Piqueres et al., 2006; Benítez et al., 2007). En estos trabajos se observó una modificación en la estructura de la comunidad de bacterias y hongos causado por el agregado de composts, especialmente en la abundancia relativa de fragmentos de restricción terminales predominantes (T-RFs), se ha observado un aumento en la abundancia de T-RFs que corresponden a géneros que poseen especies con capacidad promotora del crecimiento vegetal actuando como biocontroladores de hongos fitopatógenos. Dichos fragmentos se correlacionaron directamente con el grado de supresividad observado frente a dichos hongos en ensayos *in vivo* realizados con los suelos tratados con compost y otros tratamientos orgánicos.

En ningún caso se ha observado una reducción de la biomasa de microorganismos provocado por adición de compost al suelo, en algunos casos la biomasa permanece sin cambio y en otros aumenta (Pérez -Piquerez et al., 2006) y en cuanto a la diversidad se observó una tendencia (no significativa) al aumento de T-RFs detectados (Tiquia et al., 2002). Esto indica que los composts no tienen efectos letales sobre la flora, por lo contrario la favorece por varios mecanismos siendo uno de los principales el aporte de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Bailey y Lazarovits, 2003).

Recientemente se han aislado cepas pertenecientes a los géneros *Serratia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* con propiedades promotoras de crecimiento vegetal a partir de composts y vermicompost (Hameeda et al., 2006). En el mismo estudio también se encontraron actividades microbianas de solubilización de fósforo, de producción de fitasas, de

sideróforos, de ácido indol acético (IAA), de ACC deaminasa, de ácido cianhídrico (HCN) y de quitinasas (solo en cepas aisladas de vermicompost). Estos compuestos pueden actuar en el control de hongos patógenos (HCN, sideróforos y quitinasas) y en la productividad vegetal (IAA, solubilizadores de fósforo). Estos hallazgos explicarían los efectos observados en un estudio anterior, donde una dosis creciente de vermicompost (10%, 20% y 40%) elaborado a partir de estiércol suino en una mezcla con el sustrato a base de turba provocó un aumento en el tamaño de los frutos de tomate cosechados con respecto al control (Atiyeh et al., 2000). Estas diferencias no fueron causadas por los niveles de nutrientes, ya que todos los tratamientos fueron frecuentemente suplementados con el mismo nivel de estos, lo cual implica que otros factores estuvieron involucrados, posiblemente las actividades microbiológicas presentes en el vermicompost.

Si bien existen trabajos que estudian el efecto del agregado de vermicompost en suelos como se señaló anteriormente, no existen trabajos en los que se correlacione los efectos sobre la comunidad bacteriana y actividad microbiana del suelo y la productividad de un cultivo. Esta correlación es fundamental para entender el efecto de las enmiendas en la producción agrícola.

En este sentido el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la incorporación de vermicomposts sobre la comunidad microbiana del suelo, la actividad microbiana y la productividad de un cultivo de tomates. El estudio se realizó en un suelo de invernáculo de producción comercial, con una historia previa de manejo convencional (con aplicación de agroquímicos) y cultivado con plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Dominique).

3 Materiales y Métodos

3.1 Ensayo en suelo de invernáculo

El ensayo se realizó durante el ciclo productivo 2005-2006, en un invernáculo plástico (52m de largo por 18m de ancho) en el Departamento de Canelones, Uruguay. El tipo de suelo fue un brunosol subéutrico (Duran, 1985), cuyas principales características son: 76 % arena, 3.4 % limo, 18% de arcilla y 2.6 % de materia orgánica.

Previo al cultivo se realizó una incorporación de abono verde de avena al suelo. Antes y después del encanterado se aplicó por aspersion al suelo insecticida Carbofurán, a una dosis equivalente a 10L/Ha. en todo el invernáculo, salvo en una parcela (SFV), en la que no se aplicó. Previo a la segunda aplicación de insecticida a la misma dosis que la anterior, se incorporó cama de pollo a razón de 6 Tn/Ha a todos los canteros. Las parcelas experimentales fueron delimitadas con las siguientes dimensiones, 5m de largo por 80 cm de ancho.

En el mes de Agosto se aplicaron en forma aleatoria los vermicomposts al suelo de las parcelas experimentales, utilizando el siguiente procedimiento: se abrió un surco longitudinal en cada camellón y se procedió a un agregado manual de los mismos, finalmente se reconstruyó el camellón por rastrillaje cruzado.

La dosis volumétrica de aplicación de los vermicomposts fue de 10 metros cúbicos por hectárea, siendo ésta una dosis comúnmente utilizada por productores de la zona. Para el tratamiento Z (con la aplicación de vermicompost obtenido a partir de restos de zapallos), se aplicó una dosis de 18 metros cúbicos, con el fin de observar el efecto en las variables medidas de una aplicación próxima al doble de las utilizadas. Los vermicomposts empleados fueron obtenidos a partir de diferentes fuentes de desechos orgánicos y uno de ellos fue de origen comercial (Tabla 1). Los tratamientos efectuados sobre el suelo, así como las materias primas, los métodos utilizados para la elaboración de cada uno de los vermicomposts, el período de curado (lapso de tiempo

de estacionamiento del vermicompost, posterior a su cosecha y previo a su incorporación al suelo) y las dosis de aplicación equivalentes a kilogramos por hectárea se describen en la tabla 1. Los tratamientos aplicados al suelo se realizaron por triplicado, con el tratamiento control consistiendo en suelo sin incorporación de vermicomposts y con aplicación de carbofurán y un control especial (SFV) de réplica única (sin aplicación de insecticida ni vermicompost). En el mes de Setiembre se plantaron plántulas de tomate de la variedad Dominique en doble fila, con separaciones de 40 cm entre plantas y 45 cm entre las filas.

Tabla 1. Tratamientos realizados en el suelo del invernáculo, vermicomposts empleados; materias primas y métodos utilizados para su elaboración, período de curado y dosis de aplicación de los mismos

Tratamientos	Vermicompost agregado a suelo y material empleado para su elaboración	Método producción del vermicompost	Período de curado vermicompost (meses)	Dosis vermicompost (kg/ha)
Z	Restos de Zapallos	lecho	1 a 2	18000
TA	Efluentes de tambo	camellon	3	6200
COM	Comercial (estiércol vacuno)	camellon	6	5300
FVCP	Frutas+verduras+cama de pollo	lecho	12	5300
Control	Sin vermicompost			-
Control especial (SFV)	Sin vermicompost ni Carbofurán			-

3.2 Determinaciones

3.2.1 Análisis químicos de los vermicomposts utilizados en el ensayo en suelo de invernáculo

Se determinó el contenido total de nutrientes en los vermicomposts utilizados, mediante el método de pasta saturada de agua, según procedimientos clásicos utilizados por el laboratorio de análisis de suelos y sustratos de INIA La Estanzuela (Uruguay): nitrato (NO₃-), potasio (K⁺), calcio (Ca⁺⁺), magnesio (Mg⁺⁺) y el valor de pH.

3.2.2 Evaluación de parámetros agronómicos

Luego de la plantación fueron seleccionadas 10 plantas al azar por parcela experimental para medir los siguientes parámetros agronómicos durante todo el ciclo (de Setiembre a Marzo): altura máxima alcanzada por planta, número y peso total de frutos cosechados por planta, realizando un muestro cada quince días. A partir de estos dos últimos se calculó el peso promedio por fruto cosechado en cada tratamiento. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA y Kruskal – Wallis (este último para datos que no cumplieron con el supuesto de normalidad).

3.2.3 Actividad microbiana del suelo de las parcelas experimentales medida por hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA)

A los 60 días posteriores a la plantación, se extrajo de cada parcela experimental, una muestra compuesta por cinco extracciones de suelo utilizando calador, tomadas a una profundidad de 10 cm y a una distancia de 5 cm del tallo de la planta. Se determinó la actividad microbiana mediante el método de hidrólisis de FDA según el protocolo descrito por Schnürer y Rosswall (1982).

El análisis de la actividad de cada muestra de las parcelas se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA.

3.2.4 Obtención de perfiles T-RFLP del ARNr 16S para el estudio de las comunidades bacterianas del suelo de las parcelas experimentales

Para estudiar los perfiles de las comunidades bacterianas del suelo de las parcelas experimentales a través del T-RFLP del ARNr 16S, se utilizaron las mismas muestras extraídas para la determinación anterior. Éstas se conservaron a -20°C hasta su utilización. Para la extracción del ADN microbiano total, se utilizó el kit comercial “Power

SoiL” ® de MoBio laboratories Inc, Ca. USA partiendo de 0,5 a 1 g de suelo. A partir de 10-20 ng de ADN extraído, se realizó la amplificación del gen del ARNr 16S por PCR utilizando los cebadores 8F (marcado en 5' con 6-FAM) (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT)

(Weisburg et al., 1991). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 94° 5 minutos y 30 ciclos (94° 1 minuto 55° 1 minuto 72° 3 minutos) y una finalización a 72° por 7 minutos y luego 16° por 10 minutos.

El producto de PCR purificado (QIAquick purification kit, Qiagen) se digirió utilizando la enzima *Hin6I* (Fermentas Life Sciences) (que reconoce la secuencia 5' G[^]CGC3') según las indicaciones del fabricante. Los fragmentos obtenidos se precipitaron con etanol 95 % a 4 °C (por 30 minutos), se centrifugó a 14.000 RPM (30 minutos) y se lavó el pellet con 100 µl de etanol 70 %, se volvió a centrifugar a la misma velocidad por diez minutos y finalmente se secó en estufa a 65°C por cinco minutos. Los fragmentos precipitados se resuspendieron en 10 µl formamida y se separaron por electroforesis capilar utilizando un secuenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems) en el servicio que brinda el Instituto Pasteur de Montevideo, se utilizó como estándar interno TAMRA 2500 (Applied Biosystems).

Los cromatogramas fueron analizados utilizando el programa Peak Scanner (Applied Biosystems), se obtuvo entonces una matriz de tamaños de fragmentos de restricción terminal (T-RFs) e intensidad de fluorescencia (abundancia).

3.2.5 Análisis de los perfiles de T-RFLP del ARNr 16S del suelo de las parcelas experimentales

Las abundancias de los T-RFs obtenidos se estandarizaron de acuerdo a lo descrito en Dunbar et al 2000. A partir de la matriz de abundancias obtenida se calcularon los siguientes índices de diversidad y riquezas de especies (utilizando el software Primer-E v. 5, Clarke y Warwick, 2001): índice de Margalef (d)= $s-1/\ln N$; (S= número de T-RFs observados; N =

abundancia total o suma de la abundancia de todos los T-RFS) índice de de diversidad de Shannon (H')= $-\sum P_i \cdot \ln P_i$ (P_i = abundancia relativa del fragmento i); equitatividad (J')= $H'/\ln S$. Estos valores fueron analizados estadísticamente (sólo para el caso donde se contaba con los valores de las tres réplicas) por ANOVA seguido por test de Tukey (HSD). Se realizó el análisis de agrupamiento (cluster) de los resultados de abundancia relativa obtenidos en el T-RFLP basado en similitud de Jaccard y finalmente un análisis de componentes principales (PCA), utilizando los T-RFs que aportan al menos un 5 % a la abundancia total en el perfil T-RFLP de cada muestra.

Se comparó los tamaños de los T-RFs predominantes (mayor de 5% de abundancia relativa) con los T-RFs calculados *in silico* (software MEGA 4, Kumar et al., 1994) a partir de la secuencia del gen del ARNr de 16S obtenidos del banco de datos (NCBI, [http:// ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)) y la bibliografía (Tiquia et al., 2002).

4 Resultados

4.1 Análisis químicos de los vermicomposts utilizados en el ensayo

Como se muestra en la Tabla 2, el vermicompost utilizado en el tratamiento TA (de efluentes de tambo) posee el más bajo contenido de los nutrientes analizados. En general el resto de los vermicomposts presentan valores totales similares (del mismo orden de magnitud) en los nutrientes y pH.

Tabla 2. Niveles de nutrientes y pH para los vermicomposts utilizados en el ensayo de invernáculo

Vermicomposts utilizados en el ensayo de invernáculo (fuente de desecho empleada)	pH (H ₂ O)	N-NO ₃ ⁻ (mg/ml)	K ⁺ (mg/ml)	Ca ⁺⁺ (mg/ml)	Mg ⁺⁺ (mg/ml)
Restos de zapallos	7	761	567	252	201
Efluentes de tambo	6,7	299	106	85	88
Comercial	6,8	734	496	340	334
Frutas verduras y cama de pollo	6,6	792	400	379	402

4.2 Evaluación de parámetros agronómicos

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos efectuados en el suelo de invernáculo, en los parámetros agronómicos evaluados (altura máxima alcanzada por planta, número y peso total de frutos por planta y peso promedio por fruto) en el ensayo de cultivo de tomates. En la figura 1d se muestra los pesos promedios por fruto obtenidos con los tratamientos. Con el tratamiento FVCP se obtuvo un valor significativamente mayor ($KW-H(4,15)=10.0666$, $p=0.0393$) con respecto al tratamiento control, siendo los valores de media de 159 y 138 gramos respectivamente. Con este tratamiento no se observaron diferencias significativas en los restantes parámetros agronómicos evaluados con respecto al control.

Con el tratamiento COM se alcanzaron los valores más altos en todos los parámetros agronómicos evaluados, pero los valores medios no fueron significativamente superiores con respecto al control (figuras 1a, 1b, 1c y 1d).

Con el tratamiento Z se observó la mayor variabilidad de valores en todos los parámetros agronómicos evaluados, con valores medios inferiores (no significativos) con respecto al control.

Finalmente con el tratamiento TA no se observaron diferencias significativas con respecto al control en ninguno de los parámetros evaluados.

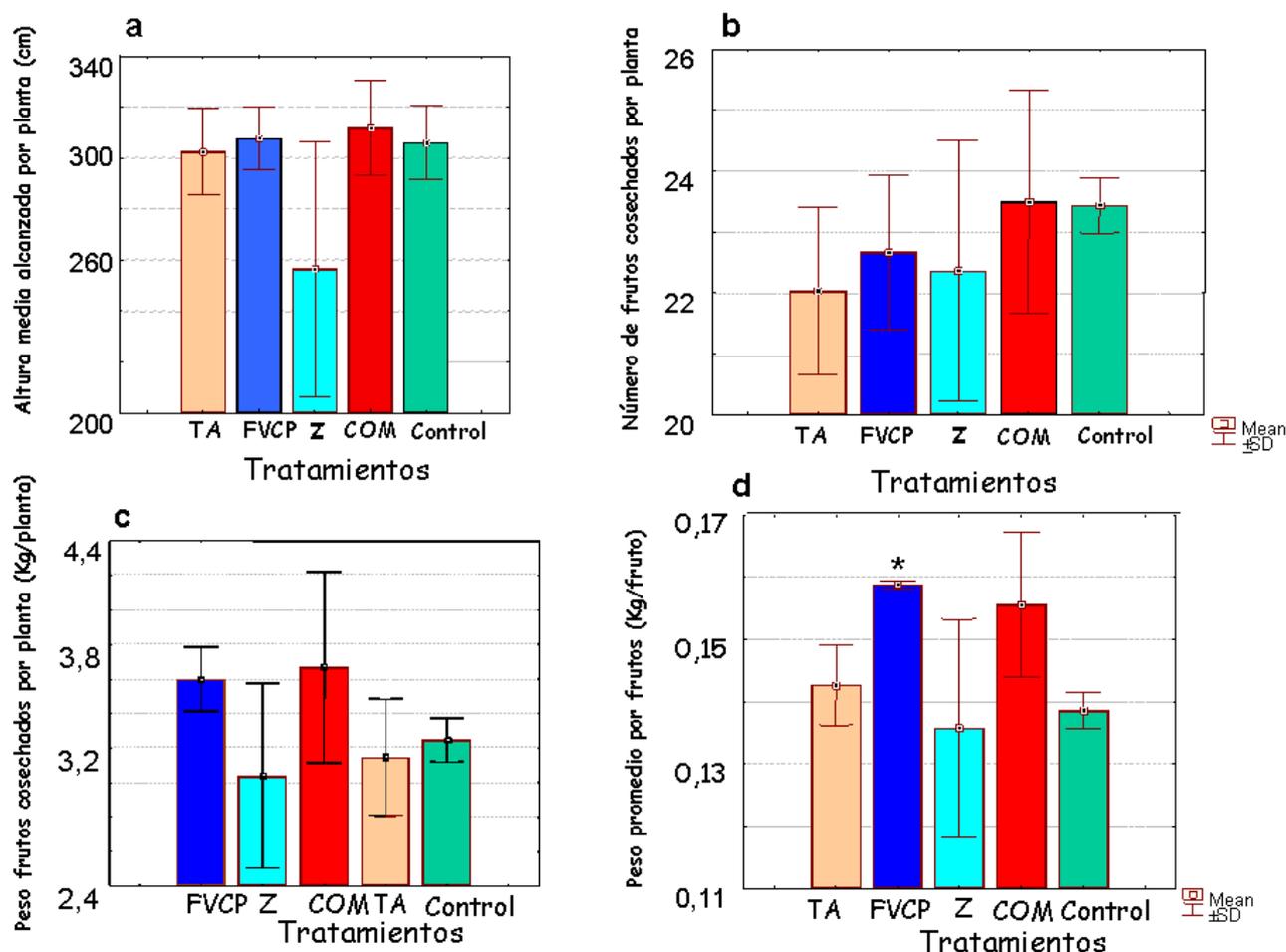


Figura 1. Parámetros agronómicos evaluados en el ensayo de cultivo de tomate en suelo de invernáculo.

a. Altura máxima en centímetros alcanzada por planta con los diferentes tratamientos.

b. Número de frutos cosechados por planta en cada tratamiento. **c.** Peso total de frutos cosechados por planta en cada tratamiento. **d.** Peso promedio por fruto obtenido por cada tratamiento. **FVCP:** tratamiento con vermicompost obtenido a partir de restos de frutas, verduras y cama de pollo, **Z:** tratamiento con vermicompost obtenido a partir de restos de zapallos, **TA:** tratamiento con vermicompost obtenido a partir de efluentes de tambo, **COM:** tratamiento con vermicompost comercial, **Control:** tratamiento control (con aplicación de insecticida carbofurán y sin agregado de vermicomposts).

Columna seguida por * representa un valor significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto al del control.

4.3 Actividad microbiana del suelo de las parcelas experimentales medida por hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA)

La actividad microbiana medida por la hidrólisis de FDA mostró que ésta fue significativamente mayor en los tratamientos Z y TA (ANOVA: F

(4,10)=21.505, $p= 0.00007$), con respecto al tratamiento control y a los tratamientos FVCP y COM (Figura 2). Estos resultados se relacionaron directamente con la dosis de vermicompost empleada e inversamente con el tiempo de curado, teniendo los vermicomposts Z y TA el menor tiempo (1 y 3 meses respectivamente). Los aplicados en menores dosis y con un tiempo de curado superior a los 6 meses, no provocaron un aumento significativo con respecto al control.

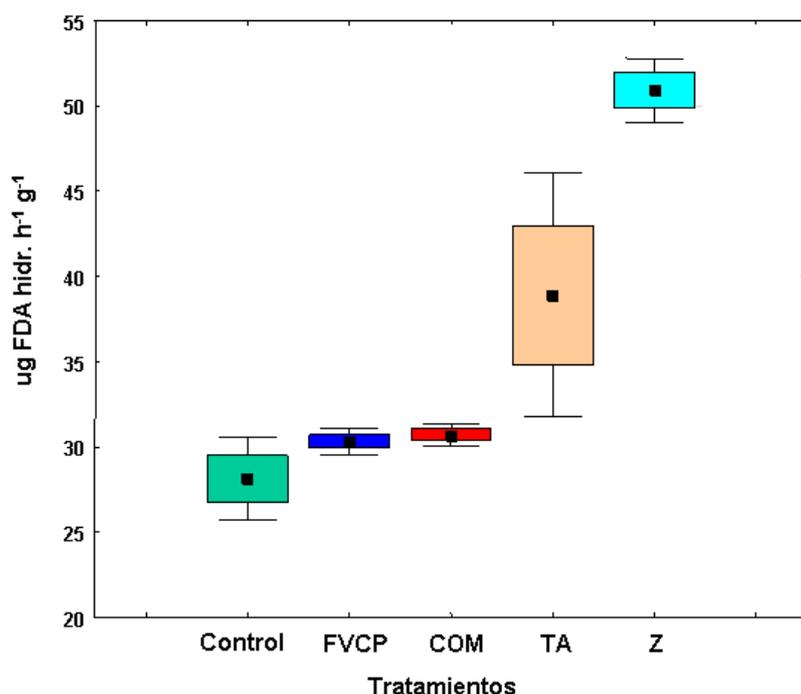


Figura 2. Actividad microbiana en los tratamientos medida por hidrólisis de FDA, μg de FDA hidrolizados por hora, por gramo de suelo. **Control:** tratamiento control (con aplicación de insecticida carbofurán y sin agregado de vermicomposts), **FVCP:** tratamiento con vermicompost obtenido a partir de restos de frutas, verduras y cama de pollo, **COM:** tratamiento con vermicompost comercial, **TA:** tratamiento con vermicompost obtenido a partir de efluentes de tambo, **Z:** tratamiento con vermicompost obtenido a partir de restos de zapallos.

Como se aprecia en la figura 3 existe una correlación inversa no lineal (modelo exponencial) entre los pesos de frutos totales por planta obtenidos por cada tratamiento, y los valores de hidrólisis de FDA (expresados en logaritmo base 10 de los μg de fluoresceína hidrolizados por hora y por gramo de suelo).

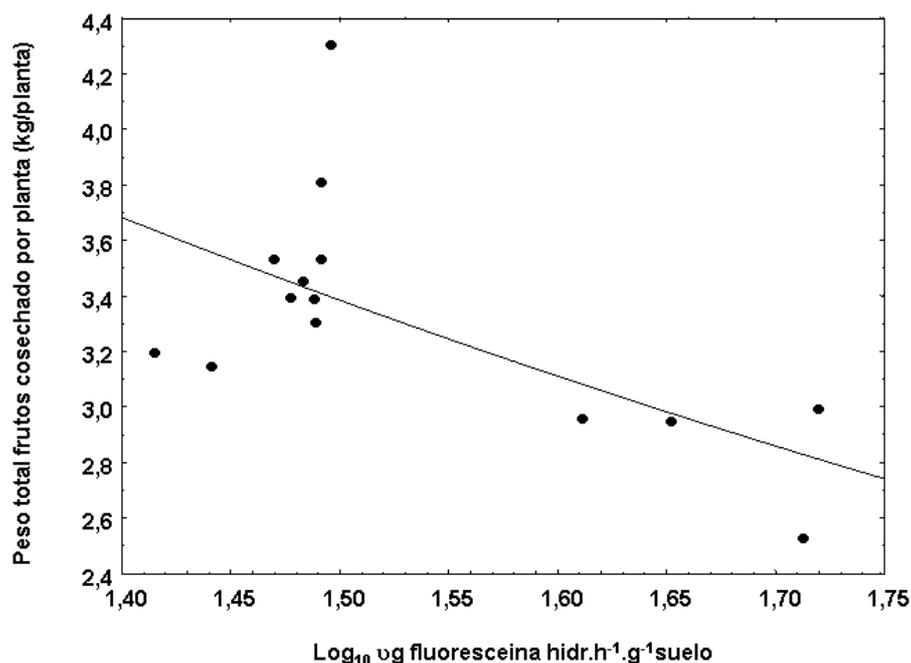


Figura 3. Correlación no lineal entre valores de pesos totales cosechados por planta en los tratamientos, en función del logaritmo de los µg de fluoresceína hidrolizados por hora y por gramo de suelo. $Y = 51,5952 \cdot \exp(-0,8435 \cdot x)$, $r = -0,6127$, $p = 0,0198$.

4.4 Análisis de las comunidades bacterianas del suelo de las parcelas experimentales

La cantidad de fragmentos de restricción terminales (T-RFs) totales observados en los diferentes tratamientos variaron entre 18 a 46, correspondiendo el menor valor a una de las réplicas del control y el segundo a una réplica del tratamiento Z. Se observó una tendencia no significativa a un aumento de riqueza y diversidad en los tratamientos con vermicomposts frente al control (tabla 3).

Los análisis estadísticos multivariados de los datos, muestran que los vermicomposts provocaron una modificación de la estructura de la comunidad bacteriana. En la figura 4a se muestra el análisis de agrupamiento (cluster), basado en el porcentaje de similitud entre el logaritmo de la abundancia de todos los T-RFs observados con el

T-RFLP. La figura 4b, es el resultado del análisis de componentes principales (PCA), llevado a cabo con la abundancia relativa de los fragmentos que aportan al menos un 5 % a la abundancia total.

Por problemas experimentales solamente se pudo obtener el perfil T-RFLP del ARNr 16S de una de las réplicas correspondientes a los tratamientos TA y COM.

Tabla 3. Número de fragmentos de restricción terminal (T-RFs), valores de índices de riqueza, diversidad y equitatividad, calculados a partir de los datos generados por T-RFLP del producto de amplificación del gen ARNr 16S.

Tratamientos	Número de T-RFs observados (S)	Abundancia total (N)	Índice de Margalef (d)	Índice de Shannon (H')	Equitatividad (J')
Z	41 (\pm 4,16) a	16676,7 (\pm 23,8) a	4,15 (\pm 0,43) a	3,23 (\pm 0,146) a	0,88 (\pm 0,04) a
FVCP	37 (\pm 4) a	16591,2 (\pm 45,6) a	3,7 (\pm 0,41) a	2,98 (\pm 0,34) a	0,83 (\pm 0,123) a
Control	31 (\pm 11) a	16652,4 (\pm 36) a	3,05 (\pm 1,13) a	2,82 (\pm 0,37) a	0,84 (\pm 0,063) a

Se muestra valor de media y desvío estándar correspondiente a cada índice, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes.

Como se puede apreciar con ambos análisis, las muestras de suelo correspondientes a tratamientos con vermicomposts, se agruparon entre si, quedando también agrupadas en el análisis de componentes principales (PCA) y diferenciadas con respecto a las del control; la muestra del control especial SFV, sin aplicación de carbofurán ni vermicompost se agrupa con las primeras.

La comparación de los tamaños de los T-RFs predominantes (mayor de 5% de abundancia relativa) con los T-RFs calculados a partir de la secuencia del gen del ARNr de 16S obtenidos del banco de datos (NCBI) y la bibliografía (Tiquia et al, 2002), mostró que entre éstos, se encuentran los que corresponderían para ciertos grupos bacterianos considerados como promotores del desarrollo vegetal como *Pseudomonas fluorescens* (T-RF: 204-208 pb.) y especies del género *Pantoea* spp (T-RF: 373 pb.)

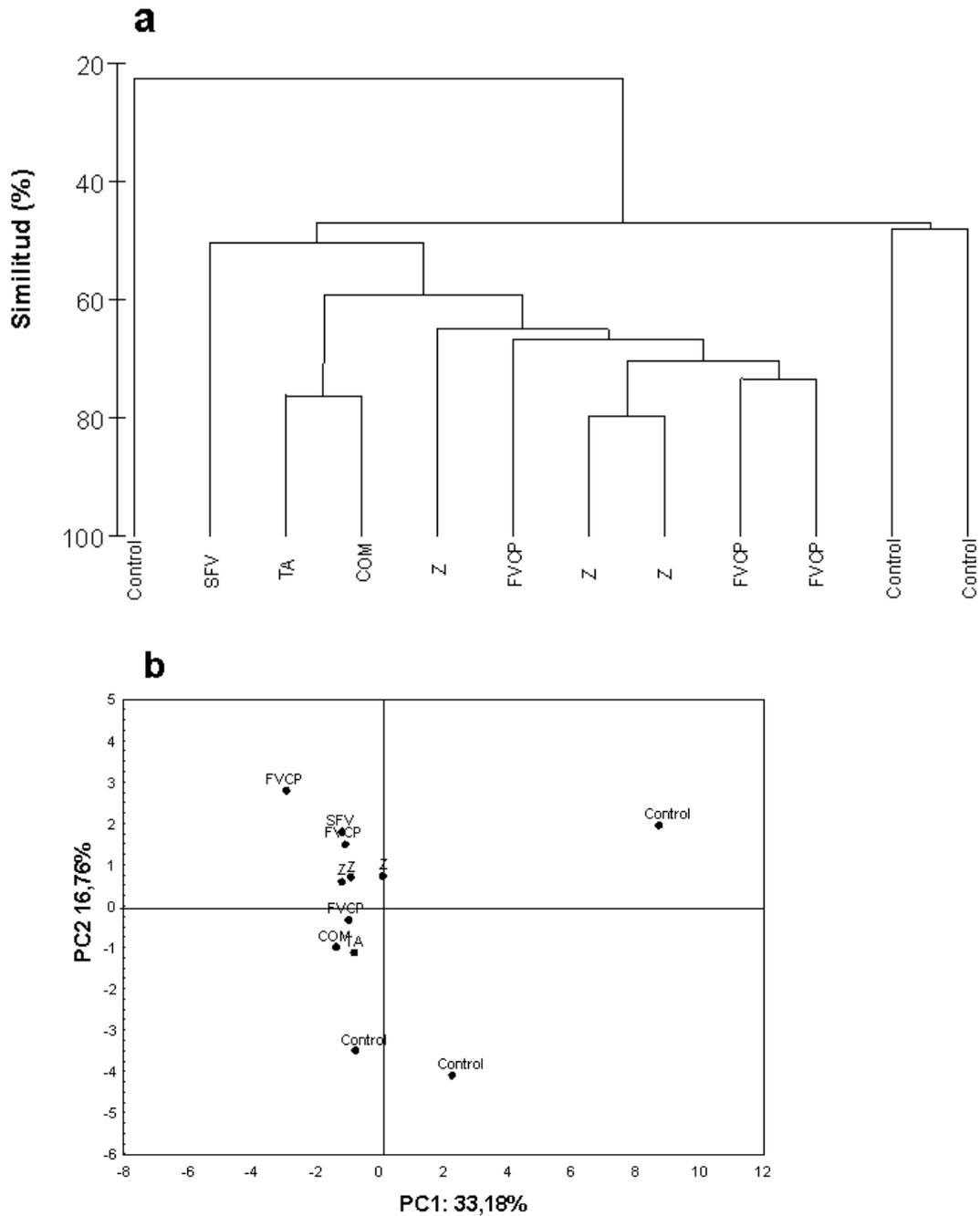


Figura 4. Análisis multivariados de los datos obtenidos por T-RFLP del gen ARNr 16S.

a. Análisis de cluster basado en similitud de Jaccard, a partir del logaritmo base 10 de la abundancia de todos los T-RFs obtenidos por T-RFLP del gen ARNr 16S.

b. Análisis de componentes principales utilizando los T-RFs que aportan al menos un 5 % de la abundancia total en cada muestra. **FVCP**: tratamiento con vermicompost obtenido a partir de restos de frutas, verduras y cama de pollo, **Z**: tratamiento con vermicompost obtenido a partir de restos de zapallos, **TA**: tratamiento con vermicompost obtenido a partir de efluentes de tambo, **COM**: tratamiento con vermicompost comercial, **Control**: tratamiento control (tratado con carbofurán y sin vermicomposts, **SFV**: control especial (sin aplicación de carbofurán ni vermicomposts).

El T-RF de tamaño 204 pb., el cual se mencionó corresponde a *Pseudomonas*, se encuentra en menor proporción en el tratamiento control y mayor para los tratamientos FVCP y Z (tabla 4).

Tabla 4. Correlación entre T-RFs observados y los calculados por restricción “in silico” a partir de las secuencias obtenidas en la base de datos NCBI y datos bibliográficos.

Cepa (nº acceso de la secuencia en NCBI)	T-RFs correspondientes	Abundancia relativa promedio en las muestras		
		Z	FVCP	Control
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^(a) (EU854430) <i>Pseudomonas</i> spp ^(b)	204-208	910	1493	232
<i>Pantoea</i> spp ^(b)	373 -375	420	790	282

Los valores promedios de las abundancias de los T-RFs se calcularon a partir de las abundancias relativas en las tres réplicas.

(a) Calculado a partir de la secuencia depositada en NCBI

(b) Datos de Tiquia et al. 2002

Para el caso del T-RF de tamaño 373 pb. (correspondiente a *Pantoea*), también es más abundante en el tratamiento FVCP, seguido por el Z con respecto al control (tabla 4).

5 Discusión

Las aplicaciones de los vermicomposts correspondientes a los tratamientos FVCP y COM provocaron efectos positivos en el cultivo de tomate, obteniéndose significativamente frutos de mayor peso con respecto al control. Esto puede deberse a diversos factores, como mejoras en la disponibilidad de nutrientes y en los parámetros físicos del suelo (como la porosidad) (Atiyeh et al, 2000), presencia de auxinas y fitohormonas como el ácido indol acético (IAA) y otras auxinas producidas por bacterias presentes en los vermicomposts (Hameeda et al, 2006) entre otros. Los resultados en el presente trabajo indican que no hubo una correlación entre la productividad vegetal y el nivel de

nutrientes de los vermicomposts, ya que el vermicompost correspondiente al tratamiento Z presentó niveles totales altos de éstos y además fue aplicado en una dosis volumétrica superior al resto y sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas en los parámetros agronómicos evaluados. Por otro lado la correlación inversa que se observó entre los pesos totales cosechados por planta en los tratamientos y la actividad microbiana medida por hidrólisis de FDA, indicaría que existió una competencia por nutrientes (inmovilización) entre la biomasa microbiana y las plantas. Se demostró que existe una correlación directa entre la tasa de hidrólisis de FDA y la biomasa microbiana en un suelo al que se le incorporó diferentes tipos de composts, estando relacionada la biomasa directamente al estado de madurez de estos y no a la fuente de materia orgánica empleada para su elaboración (Sánchez-Monedero et al, 2008). La madurez de un compost se alcanza sometiéndolo a un período de estacionamiento, también denominado curado, donde la actividad y la biomasa microbiana decrecen (Forster et al, 1993; Erhart et al, 1999). Esto refuerza la hipótesis de que existió una inmovilización de nutrientes por la biomasa microbiana, dado que los vermicomposts de los tratamientos Z y TA contaron con un menor período de curado, una mayor actividad microbiana y con ellos no se obtuvieron valores significativamente mayores en los parámetros agronómicos con respecto a los del control. Esta hipótesis podría probarse en un próximo ensayo, con un diseño experimental en el que se cuente con vermicomposts elaborados a partir de una única fuente de desecho determinada, y con diferentes períodos de curado

Como ya fuera reportado en trabajos previos (Tiquia et al, 2002; Pérez-Piqueres, 2006), la aplicación de composts modifica la estructura de la comunidad bacteriana del suelo, produciendo una tendencia al aumento (no significativo) en la riqueza y diversidad de determinados grupos. En el presente trabajo, dicha modificación es también notoria en la abundancia relativa de los grupos predominantes del suelo

detectados por fragmentos de restricción terminal (T-RFs que aportan al menos un 5% de la abundancia total), dentro de los cuales se encontraron los correspondientes a grupos o géneros que promueven el crecimiento vegetal. Los vermicomposts de de los tratamientos FVCP y Z provocaron un aumento frente al control de los T-RFs 373 pb. y 204 pb., correspondientes a los géneros *Pantoea* y *Pseudomonas* respectivamente. Dichos aumentos observados en las abundancias relativas de *Pseudomonas* y *Pantoea*, concuerdan con resultados obtenidos en otros trabajos científicos, donde se demuestra que esto es un efecto común provocado por los composts en el suelo (Boehm et al 1993, Tiquia et al 2002). Recientemente se demostró que el aumento provocado sobre las *Pseudomonas* por la aplicación de compost de estiércol suino a suelo cultivado con plantas de maíz, no solo es en su abundancia relativa, sino además en la diversidad de especies y en la diversidad funcional y catabólica de estas (Chang et al, 2008). Como es sabido las *Pseudomonas* producen diversos compuestos que son capaces de controlar hongos fitopatógenos (Rosales et al, 1995), por lo cual su presencia en el suelo puede resultar beneficiosa para los cultivos de vegetales.

Dentro de los organismos del género *Pantoea* se han encontrado varias cepas que colonizan los tejidos vegetales vivos (cepas endófitas) y promueven el crecimiento vegetal en diferentes formas: existen especies que producen antibióticos capaces de controlar hongos fitopatógenos (Stockwell et al, 2002) y algunas cepas aisladas recientemente a partir de hojas de plantas de tomate cultivadas a campo, mostraron tener propiedades biocontralodoras muy eficaces (Enya et al, 2007). También son capaces de atenuar ciertas bacteriosis vegetales (Zhang et al, 1997); algunas cepas son diazotrófas, es decir son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y enriquecer a la planta con este nutriente (Asis y Adachi, 2003). Por lo tanto el hecho de que con el vermicomposts utilizado en el tratamiento FVCP se obtuvo un mayor rendimiento (con frutos de mayor tamaño), se podría deber también a que este presentó niveles altos de abundancia para organismos con propiedades promotoras de

crecimiento vegetal, además de haber presentado conjuntamente un nivel total de nutrientes y una actividad microbiana adecuados para el cultivo.

Dado que estos T-RFs esperados para las especies promotoras de crecimiento vegetal mencionadas (especialmente el T-RF 204) también corresponden a otras especies distintas, sería recomendable que en un próximo ensayo se realicen aislamientos *in vitro* para identificar cepas de *Pseudomonas* sp y *Pantoea* sp y poder estudiar directamente sus propiedades promotoras de crecimiento vegetal, así como analizar sus secuencias de ARNr 16S y poder verificar los T-RFs correspondientes.

Los resultados de este estudio sugieren que los vermicomposts podrían revertir el efecto causado por la aplicación del pesticida carbofurán sobre la comunidad bacteriana del suelo. Esto se evidencia debido a que en los análisis multivariados efectuados con los datos del T-RFLP del ARNr 16S, la comunidad de la muestra de suelo sin tratar con dicho insecticida (SFV), mostró un mayor grado de similitud con las de suelo tratado con éste y vermicomposts. Este fenómeno debe ser probado con un modelo experimental adecuado, lo cual sería muy interesante como una alternativa tecnológica para la recuperación biológica de suelos degradados por manejos inadecuados o por la aplicación continua de agroquímicos como el carbofurán u otros.

Estos resultados son una evidencia más de que para una aplicación de las enmiendas orgánicas en forma racional y con base científica a suelos de uso agrícola, se debe tener en cuenta no solo a los clásicos parámetros físicos y químicos como indicadores de calidad, sino también a los parámetros biológicos. Dentro de estos últimos sería muy interesante seguir profundizando en el estudio de la correlación entre la composición de la comunidad microbiana y la productividad agrícola.

6 Bibliografia

- Altieri, M.** 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74, 19-31.
- Asis, C. Adachi, K.** 2003. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem. *Japan. Lett Appl. Microbiol* 38:19-23.
- Atiyeh, R.M., Arancon, N., Edwards, C.A., Metzger, J.D.** 2000. Influence of earthworm processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. *Biores. Technol.* 75. 175-180.
- Bailey, K.L., Lazarovitz, G.** 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and Tillage Research*. 72. 1169-180.
- Benítez, M.S., Tustas, F.B., Rotenberg, D., Kleinhenz, M.D., Cardina, J., Stinner, D., Miller, S.A., McSpadden, G.** 2007. Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. *Soil Biol. Biochem.* 39. 2289-2301.
- Bohem, M., Madden, L., Hoitink, H.** 1993. Effect of organic matter decomposition level on bacterial species diversity and composition in relationship to *Pythium* damping-off severity. *App. and Env. Microbiol.* 59 (12), 4171-4179.
- Chaoui, H., Edwards, C., Brickner, A., Lee, S., Arancon, N.** 2002. Suppression of the plant parasitic diseases: *Pythium* (damping off), *Rhizoctonia* (root rot) and *Verticillium* (wilt) by vermicompost. International Symposium on Earthworm Ecology, Sep. 1-6, Cardiff, Wales.
- Chaoui, H., Zibilske, L. Ohno, T.** 2003. Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability. *Soil Biol. Biochem.* 35. 295-302.
- Chang, C.Y., Chao, C.C., Chao, W.L.** 2008. Community structure and functional diversity of indigenous fluorescent *Pseudomonas* of long term

swine compost applied maize rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 40. 495-504.

Clarke, K.R, Warwick, R.M. 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. 2nd edition: Plymouth Marine Laboratory, PRIMER-E, Plymouth, UK, 172pp.

De Brito Alvarez, M., Gagne, S., Antoun, H. 1995. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of Plant Growth-Promoting Rhizobacterias. *App. and Env. Microbiol.* 61 (1), 194-199.

Dunbar, J., Lawrence, O., Kuske, C. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *App. and Env. Microbiol.* 66 (7), 2943-2950.

Duran, A. 1985. Los suelos del Uruguay. Editorial hemisferio sur. pp145-152

Enya, J., Koitabashi, M., Shinohara, H., Yoshida, S., Tsukiboshi, T., Negishi, H., Suyama, K., Tsushima, S. Phylogenetic diversities of dominant culturable *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Pantoea* species on tomato leaves and their possibility as biological control agents. *J. Phytopatol.* 155.446-453

Erhart, E., Burian, K., Hartl, W., Stich, K. 1999. Suppression of *Pythium ultimum* by biowaste composts in relation to compost microbial biomass, activity and content of phenolic compounds. *J. Phytopatol.* 147. 299-305.

Forster, C., Zech, W., and Wurdinger, E. 1993. Comparison of chemical and microbiological methods for the characterization of the maturity of compost from contrasting resources. *Biol. Fertil. Soils.* 16. 93-99.

Hameeda, B., Rupela, O.P., Reddy, G., Satyavani, K. 2006. Application of plant growth promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Peral Mollet (*Pennisetum glaucum* L.) *Biol. Fertil. Soils.* 43. 221-227.

Hoitnk, H. and Fahy, P. 1986. Basis for the control of soil-borne plant pathogens with composts. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24. 93-114.

- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M.** 1994. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* 10. 189-191.
- Matson, P.; Parton, J. & Swift, M.** 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*.277. 504-509.
- Orozco, F.H., Cegarra, J., Trujillo, L.M., Roig, A.** 1996. Vermicomposting of coffee pulp using the earthworm *Eisenia fetida*: Effects on C and N contents and the availability of nutrients. *Biol. Fertil. Soils.* 22, 162-166
- Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C.** 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biol. Biochem.* 38.460-470.
- Rosales, A., Thomashow, L., Cook, R., Mew. T.** 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice associated antagonistic *Pseudomonas spp.* *Phytopatol.* 85. 1028-1032.
- Sánchez-Monedero, M.A., Mondini, C., Cayuela, M.L., Roig, A., Contin, M., De Nobili, M.** 2008. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biol. Fertil. Soils.* 44. 885-890.
- Schnürer, J., Rosswall, T.** 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *App. and Env. Microbiol.* 43, 1256-1261.
- Stockwell, V.; Johnson, K.; Sugar, D.; and Loper, E.** 2002. Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopatol.* 92. 1202-1209.
- Tiquia, M., Lloyd, J., Herms, D., Hoitink, H., and Michel, F.** 2002. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of T-RFLPs of PCR -amplified 16S rRNA genes. *App. Soil Ecol.*21. 31-48.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology.* 173. 697-703.

Zhang, L., Birch, R. 1997. The gene for albidicin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. Proc. Natl Acad. Sci. Usa 94:9984-9989.



Capítulo 2

Estudio de la relación entre la estructura de la comunidad bacteriana y la capacidad supresiva a *Rhizoctonia solani*, de sustratos en base a vermicomposts



Estudio de la relación entre la estructura de la comunidad bacteriana y la capacidad supresiva a *Rhizoctonia solani*, de sustratos en base a vermicomposts

1 Resumen

En el presente trabajo se estudió la supresión del damping-off causado por *Rhizoctonia solani*, por el agregado de diferentes materiales compostados durante el crecimiento de plántulas de tomate. Ensayos de supresividad mostraron que dos de los cuatro sustratos evaluados fueron supresivos, uno en base a vermicompost elaborado a partir de efluentes de tambo y otro a partir de vermicompost de restos de frutas y hortalizas. Se estudió la composición de las comunidades bacterianas de los sustratos mediante T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms) del gen del ARNr 16S. Análisis multivariados (Cluster y PCA) a partir de las abundancias relativas de los T-RFs predominantes, mostraron que los sustratos supresivos al patógeno presentaron una mayor similitud entre sí, que frente a otros no supresivos, indicando la existencia de una correlación entre la estructura de la comunidad bacteriana y la capacidad supresiva de un sustrato. Los T-RFs predominantes se correlacionaron con secuencias obtenidas de una librería genómica del gen ribosomal ARNr 16S de un vermicompost supresivo. El análisis de PCA también reveló que tres T-RFs están directamente correlacionados únicamente a los sustratos supresivos. Estos T-RFs se correlacionaron con secuencias provenientes de los siguientes géneros: *Burkholderia*, *Duganella*, *Telluria*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*. Estos géneros presentan especies con capacidad biocontroladora sugiriendo que el agregado de vermicompost promueve la supresión al damping-off de *R. solani* debido a la incorporación de microorganismos biocontroladores.

Palabras clave: biocontrol, damping-off, T-RFLP ARNr 16s, hidrólisis de FDA

2 Introducción

La producción comercial de plántulas (hortícolas, ornamentales y forestales) en contenedor requiere del uso de sustratos que aseguren la mayor tasa de germinación y emergencia, un correcto desarrollo y el mayor índice de supervivencia de dichas plántulas hasta el momento de su implantación (Abad, 1991). En los últimos años en los países en vía de desarrollo se le ha prestado atención a la búsqueda de nuevas formulaciones de sustratos a partir de recursos autóctonos debido a los altos costos y al impacto ambiental generado por la extracción de turba (Avilés y Tello, 1993). Las estrategias adoptadas para la sustitución de estos productos ha sido el aprovechamiento de residuos orgánicos provenientes de la actividad agroindustrial local, mediante sistemas de compostaje que permiten estabilizar la materia orgánica y convertirla en un producto que puede ser usado para mejorar la fertilidad del suelo o ser utilizado como sustrato (Chen and Hadar., 1987). Por otra parte existen también residuos recalcitrantes cuya descomposición es difícil de llevar a cabo, como es el caso de la cáscara de arroz, siendo la incineración total o parcial una estrategia para su disposición. En Uruguay esta viene siendo una de las alternativas más usadas en las zonas de producción arroceras, pero la disposición final de las cenizas generadas también acarrea problemas ambientales dado el importante y creciente volumen a disponer cada año (300.000 toneladas de cáscara por año, www.aca.com.uy). Una alternativa (entre otras) a la incineración ha sido su distribución entre productores hortícolas para ser utilizada como sustrato, dado que posee muy buenas características físicas (porosidad, densidad, etc), pero carece de los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plántulas, por lo cual es necesaria una mezcla con materiales compostados.

El fenómeno de supresividad frente a diversas fitopatologías fúngicas asociados al uso de composts en contenedor ha sido recurrentemente evaluado (Lumsden et al, 1983, Hoitink y Fahy, 1986; Chen et al.,

1988; Mandelbaum et al, 1988). Según Baker y Cook, 1974 y Huber y Schneider, 1982 un suelo o sustrato supresivo se define como aquel que no permite el desarrollo de un patógeno vegetal o la aparición de los síntomas asociados al mismo

Se observó que la supresividad de un compost frente a un determinado fitopatógeno es variable y depende de diversos factores siendo los más importantes la fuente de residuos empleada y el período de curado al que fue sometido (Craft y Nelson, 1996; Erhart et al., 1999). Estas variables se correlacionaron directamente con la actividad microbiana y la composición de la comunidad microbiana. Se detectó supresividad en composts en los que se aisló, mediante cultivo *in vitro*, cepas con actividad antagónica frente a determinados hongos como *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* entre otros (de Brito Alvarez et al., 1995). También se determinó que un compost supresivo a *Pythium ultimum* tenía un perfil de ácidos grasos diferente al de uno no supresivo (conductivo), indicando diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas (Boehm et al., 1993). En este trabajo se sugiere que varios grupos de bacterias contribuyen a dicha supresividad, encontrándose una correlación positiva con la abundancia y dominancia de especies pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Los vermicomposts son un tipo especial de compost, en el cual la materia orgánica a estabilizar es procesada mesofílicamente (a temperatura ambiente) mediante lombrices, siendo *Eisenia fetida* la especie mundialmente más utilizada para tratar residuos orgánicos de diversos orígenes (Hartenstein and Bisesi, 1989; Chan y Griffiths, 1988; Mitchell et al., 1980). La acción mecánica de este organismo acelera la tasa de descomposición de la materia orgánica mediante una vía de humificación (Hartenstein y Hartenstein, 1981).

La supresividad mediada por vermicompost (obtenido a partir de desechos alimenticios) frente a la podredumbre de raíz causada por *Rhizoctonia solani* en plántulas de rábano, fue reportada por Chaoui et

al., 2002. Se obtuvo una supresividad significativa en una dosis igual o superior al 40 % (v/v) en una mezcla con turba. Un resultado similar se observó con una mezcla de vermicompost (obtenido a partir de rúmen vacuno) con ceniza de cáscara de arroz (60% ceniza a 40 % vermicompost, v/v), en donde se observó supresividad a damping-off de *R. solani* en almácigos de tomate (Robledo y Grosso, sin publicar)

La supresividad mediada por composts a *R. solani* y a otros patógenos como *Sclerotium rolfii* es del tipo “específica” y no “general” como para el caso de otros patógenos como *Pythium spp.* y *Phytophthora spp.* (Baker y Cook, 1983), ya que se observó que está asociada a un grupo reducido de microorganismos fúngicos (como *Trichoderma spp.* y *Gliocladium sp*) (Kuter et al., 1983) y bacterianos (como *Flavobacterium sp.*, *Xanthomonas maltophilia* y *Bacillus spp*) (Hoitink y Fahy, 1986).

Estudios posteriores también demostraron que el contenido de celulosa en un compost afecta la supresividad a *R.solani*, donde a pesar de existir una microflora supresiva, la presencia de celulosa lo hace conductivo al patógeno (Chung et al, 1988).Por el contrario, los trabajos de Tuitert y colaboradores (1998) observaron que la adición de celulosa en un compost (obtenido a partir de restos de frutas, hortalizas y restos de poda) con un periodo de maduración o de curado prolongado (de alrededor de 7 meses), provocaba un aumento en la supresividad a *R. solani*, correlacionándose con el aumento durante este período de la abundancia de microorganismos celulolíticos y oligotróficos.

De acuerdo a lo discutido anteriormente, trabajos previos demostraron que la supresividad asociada a un compost y vermicomposts (frente a *R. solani*) es del tipo específica (dependiente de un número reducido de microorganismos), por lo tanto, para entender este efecto es necesario estudiar cuáles son estos microorganismos y si el proceso de vermicompost favorece su desarrollo.

En este sentido, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de supresión del damping-off de materiales compostados producidos a partir de diferentes desechos agrícolas y determinar si existe una

correlación entre la supresión y la estructura de la comunidad bacteriana. Se buscó entonces, correlacionar la capacidad de supresión con la presencia de microorganismos biocontroladores que puedan explicar el efecto de supresión.

Para ello se utilizaron sustratos en base a materiales compostados (compost termófilo y vermicomposts) y ceniza de cáscara de arroz. Se estudió el efecto de supresión frente al patógeno *R. solani* para la producción de plántulas de tomate en contenedor.

La composición de la comunidad microbiana de los sustratos se determinó por análisis de T-RFLP del gen del ARNr 16S. Este método permite analizar en forma rápida y reproducible la estructura de las comunidades bacterianas presentes en diferentes muestras edáficas y compararlas mediante métodos multivariados (Dunbar et al., 2000, Pérez-Piqueres et al., 2006, Benitez et al., 2007). Los T-RFs predominantes se correlacionaron con secuencias obtenidas de una librería genómica del gen ribosomal ARNr 16S de un vermicompost supresivo y con secuencias obtenidas del banco de datos (RDP).

3 Materiales y métodos

3.1 Ensayos de supresión a *R. solani*

Los sustratos empleados y sus composiciones se muestran en la tabla 1. La cepa de *R. solani* utilizada fue cedida gentilmente por la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía (Universidad de la República).

Cada ensayo consistió en cuatro replicas por tratamiento, siendo cada réplica una bandeja de plástico de veinticuatro celdas (15 celdas para el ensayo con sustrato CTA) donde se agregó el sustrato y el inóculo del patógeno agregando dos discos de 0,5 cm. de diámetro por celda, de un cultivo de 5 días de éste en medio PDA (papa-dextrosa- agar) (Tuiter et al., 1998). Estos tratamientos fueron incubados durante una semana

y luego se sembró una semilla de tomate (*Lycopersicum esculentum* cv. Loica) por celda.

Los controles (cuatro réplicas) consistieron en los respectivos sustratos sin inóculo de hongo.

Al cabo de treinta días (cincuenta días para CTA) posteriores a la siembra se contabilizaron las plántulas viables y con síntomas de damping-off post-emergente y se determinó el peso fresco de la parte aérea de las plántulas sanas. Se analizaron estadísticamente (ANOVA) por separado cada par de sustrato (50% vermicompost + 50% ceniza cáscara de arroz) con y sin inóculo de *R. solani*.

Las incubaciones de los sustratos inoculados con el patógeno y los ensayos de crecimiento de las plántulas fueron llevados a cabo en un cuarto acondicionado para ello, con un sistema artificial de luz con un fotoperíodo de 14 horas y una temperatura promedio de 25 °C. El riego fue realizado diariamente para mantener una humedad de aproximadamente un 60 %.

3.2 Análisis fisicoquímicos de los sustratos

Como en el caso anterior a partir de muestras de los respectivos sustratos, se determinó la cantidad total de los siguientes nutrientes con el método de pasta saturada de agua, según procedimientos clásicos utilizados por el laboratorio de análisis de suelos y sustratos de INIA La Estanzuela (Uruguay): carbono orgánico total (%), nitrógeno total (%), fósforo total ($\mu\text{g/g}$), calcio, magnesio y potasio (meq/100g). También se midió la conductividad eléctrica (mmhos/cm , 25°C) y los valores de pH en agua y en KCl).

3.3 Actividad microbiana media por hidrólisis de FDA

Se determinó la actividad microbiana mediante el método de hidrólisis de FDA según el protocolo descrito por Schnürer y Rosswall (1982)

tomando muestras de los respectivos sustratos previamente a su agregado en las bandejas.

El análisis de la actividad de cada muestra de los sustratos se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA seguido por test de Tukey (HSD).

Tabla 1. Sustratos utilizados en los ensayos de supresión a *R. solani*. Se indica la composición de la mezcla y el tipo de material orgánico utilizado.

Sustratos	Composición de mezcla	Material orgánico empleado para elaborar el material compostado	Método y Escala de Producción del material compostado
VTA	50% ceniza de cáscara de arroz + 50% vermicompost VTA (V/V)	Efluentes de tambo	Vermicompostaje en windrow a escala de campo
VFV	50% ceniza de cáscara de arroz + 50% vermicompost VFV (V/V)	Restos de frutas y hortalizas	Vermicompostaje en contenedor a escala de laboratorio
VBr *	50% ceniza de cáscara de arroz + 50% vermicompost VBr (V/V)	Restos de frutas, hortalizas y cama de pollo (estiércol + cáscara de arroz)	Vermicompostaje en lecho a escala de campo
CTA	50% ceniza de cáscara de arroz + 50% compost CTA (V/V)	Efluentes de tambo	Compostaje con fase termófila en windrow a escala de campo con 80 cm. de altura

* Vermicompost tratado con el gas biocida bromuro de metilo, uno a dos meses previos a su utilización (aplicado según criterio del productor).

3.4 Obtención de perfiles T-RFLP del ARNr 16S para el estudio de las comunidades bacterianas de los sustratos

Las muestras de sustratos fueron tomadas a partir de las bandejas experimentales una vez finalizados los respectivos ensayos, separando manualmente dichos sustratos de las raíces de al menos cinco plántulas por bandeja y conservándolas a -20°C hasta el momento de la extracción del ADN microbiano total. Para dicha extracción se utilizó el kit comercial “Power Soil” ® de MoBio laboratories Inc, Ca. USA

partiendo de 0,5 a 1 g de sustrato. A partir de 10-20 ng de ADN extraído, se amplificó el gen del ARNr 16S por PCR utilizando los primers 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT) (Weisburg et al., 1991). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 94° 5 minutos y 30 ciclos (94° 1 minuto 55° 1 minuto 72° 3 minutos) y una finalización a 72° por 7 minutos y luego 16° por 10 minutos.

El producto de PCR purificado (con columnas QIAquick purification kit, Qiagen) se digirió utilizando la enzima *Hin6I* (Fermentas Life Sciences) (que reconoce la secuencia 5'G[^]CGC3') según las indicaciones del fabricante. Los fragmentos obtenidos se precipitaron con etanol 95 % a 4°C (por 30 minutos), se separaron por centrifugación (14.000 RPM por 30 minutos), el pellet se lavó con 100 µl de etanol 70 %, se volvió a centrifugar a la misma velocidad por diez minutos y finalmente se secó en estufa a 65°C por cinco minutos. Los fragmentos precipitados se resuspendieron en 10 µl formamida y se separaron por electroforesis capilar utilizando un secuenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems) en el servicio que brinda el Instituto Pasteur de Montevideo, se utilizó como estándar interno GS500LIZ (Applied Biosystems).

Los cromatogramas fueron analizados utilizando el programa PeakScanner (Applied Biosystems). Se obtuvo una matriz de tamaños de fragmentos de restricción terminal (T-RFs) e intensidad de fluorescencia (abundancia). Para alinear los cromatogramas se utilizó una tolerancia de ± 1 pb., el cual fue corroborado en una corrida de fragmentos derivados del producto de PCR y digestión con *Hin6I* del ARNr 16S de una cepa referencia de *Lactobacillus paracasei*.

3.5 Análisis de los perfiles de T-RFLP del ARNr 16S de los sustratos

Los resultados se estandarizaron de acuerdo a lo descrito en Dunbar et al., 2000. A partir de la matriz de datos se calculó el índice de diversidad e Shannon (H') = $-\sum P_i \ln P_i$ (P_i = abundancia relativa del

fragmento) y el índice de riqueza de Margalef $(d) = s - 1 / \ln N$; (S= número de T-RFs observados; N = abundancia total o suma de la abundancia de todos los T-RFS) utilizando el software Primer-E (v.5, Clarke y Warwick, 2001). Con éste mismo software se realizó el análisis SIMPER, que determina la predominancia y representatividad de los T-RFs, seleccionando a los que al menos aportan a un 5% de la abundancia total y a un 2% de similitud entre réplicas.

También con el software mencionado, utilizando los T-RFs seleccionados se llevaron a cabo análisis multivariados, de cluster basado en índice de similitud de Bray-Curtis y análisis de componentes principales (PCA), ambos utilizando la raíz cuadrada de las abundancias relativas de los T-RFs seleccionados.

3.6 Construcción de una librería del gen del ARNr 16S y análisis filogenético.

Con el objetivo de identificar los T-RFs predominantes seleccionados por el análisis SIMPER, se construyó una librería del gen ARNr 16S del sustrato VTA. Para ello se amplificó el gen en las mismas condiciones mencionadas, pero utilizando los primers 8F y 1492R sin marcadores fluorescentes. Este producto de PCR fue clonado usando el kit TOPO TA (Invitrogene) según indicaciones del fabricante. Las colonias resultantes fueron repicadas de forma aleatoria y las secuencias insertadas en el vector (plásmido) de clonado fueron determinadas usando el primer 5 prima del vector, en un secuenciador ABI Prism 3700 (Applied Biosystem) de la Michigan State University Genomics Technology Support Facility.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias depositadas en la base de datos del NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando Blastn Search y con secuencias del Ribosomal Database Project (RDP) usando la herramienta RDP-Classifer (<http://rdp.cme.msu.edu>). Se seleccionaron secuencias representativas para realizar un análisis filogenético. Para ello se alinearon con las

secuencias similares obtenidas del banco de datos utilizando el programa Clustal W; con este alineamiento se construyó un árbol filogenético usando el software MEGA versión 4 (Kumar et al., 1994), con el método Neighbor Joining, en base a algoritmos de Jukes-Cantor, se realizó un análisis de bootstrap de 500 réplicas.

Para correlacionar los T-RFs seleccionados con las secuencias de la biblioteca y a otros posibles grupos taxonómicos, se calculó el tamaño esperado de los fragmentos a partir de las secuencias mediante restricción *in silico* con la enzima *Hin6I* utilizando el software MEGA y el análisis “Virtual Digest” del software on-line MICAIII (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>).

4 Resultados

4.1 Ensayos de supresión a *Rhizoctonia solani*

En el presente trabajo se consideró que un sustrato es supresivo (aquel en donde el patógeno no crece o no se observan síntomas de infección en la plántula) cuando no se obtienen diferencias significativas en el porcentaje de plántulas viables entre bandejas con y sin inóculo de *R. solani*. En ensayos previos con plántulas de tomate, se determinó que la ceniza de cáscara de arroz era conductiva (permite el crecimiento y la aparición de síntomas asociados al hongo) al damping-off pre y post-emergente causado por *R. solani*, observándose diferencias significativas entre bandejas con y sin inóculo. (Robledo y Grosso, sin publicar). Por lo tanto la supresividad del sustrato a este patógeno depende del agregado de vermicompost. También se determinó previamente, que la mayor supresividad se obtenía a una dosis de vermicompost igual o superior al 40 % (v/v), por lo que se decidió continuar empleando una dosis de 50 %. En la figura 1A se muestra el porcentaje de plántulas viables obtenidos en ensayos con cada sustrato (con y sin inóculo de *R. solani* respectivamente). Con los sustratos VTA y VFV por comparación

de medias, no se observó una diferencia significativa entre el porcentaje de plantas viables con y sin inoculo del hongo (el porcentaje de plantas se calculo tomando como 100 % las 24 semillas sembradas). Por lo contrario tanto en el par VBr como en el CTA se obtuvieron diferencias significativas (ANOVA $F(1,6)=32.4$, $p=0.0013$ y $F(1,4)=24$, $p=0.008$ respectivamente). También se determinó como otra medida de infección o estrés causado por el patógeno, el peso fresco por plántula obtenido en los pares de sustratos. En la figura 1B se observa que no se detectaron diferencias significativas. Estos resultados llevaron a considerar a los sustratos VTA y VFV como supresivos y a los VBr y CTA como no supresivos a *R. solani*.

4.2 Análisis fisicoquímicos de los sustratos

Con el fin de detectar si existían diferencias en el contenido de nutrientes entre los sustratos, éstos fueron analizados.

Por falta de suficiente muestra solo pudieron ser los sustratos VTA y VBr. El sustrato VBr presentó los mayores niveles totales de nutrientes (tabla 2), especialmente para calcio y magnesio, los cuales son importantes para el desarrollo del tomate. La relación C/N fue de 19,1 para VTA y 13,3 para VBr.

Tabla 2. Análisis físico-químicos de los sustratos VTA y VB.

Sustratos (50% Vermicompost + 50% ceniza c. arroz)	Cond. Eléctrica	pH	pH	C.Org	N	P	Ca	Mg	K
	mmhos/cm 25°C	(H ₂ O)	(KCl)	%	%	µg P/g	meq/100g	meq/100g	meq/100g
VTA	0,93	6,08	5,5	11,54286	0,6	199,3	11,1	8,83	5,64
VBR	2,29	6,1	6,03	9,257143	0,66	258,9	20,24	16,2	4,71

VTA: sustrato obtenido a partir de mezcla de vermicompost de efluentes de tambo + ceniza de cáscara de arroz (50% v/v). CTA: sustrato a partir de mezcla de vermicompost de frutas y verduras tratado con bromuro de metilo + ceniza de cáscara de arroz (50% v/v).

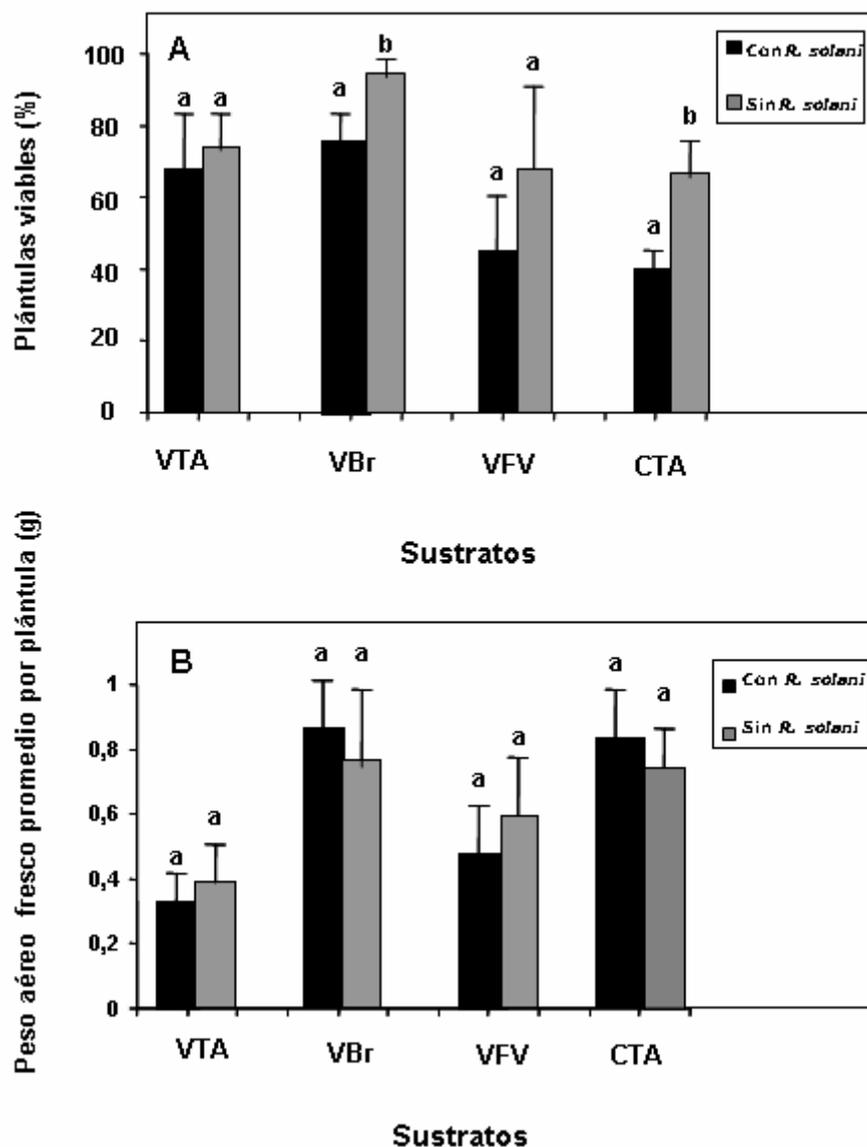


Figura 1. Porcentaje relativo de plántulas viables y peso fresco promedio de la parte aérea por plántula obtenidos en ensayos de crecimiento en presencia y ausencia de *Rhizoctonia solani*.

A. Porcentaje de plántulas de tomate viables a los 30 días luego de la siembra para los pares VTA, VBr y VFV y a los 50 días para el par CTA. Se analizan estadísticamente (ANOVA) por separado cada par de sustrato (50% vermicompost + 50% ceniza cáscara de arroz) con y sin inóculo de *R. solani*. El porcentaje se calculó tomando como 100 %, al número de semillas sembradas (24 semillas, pares VTA, VBr y VFV, 15 semillas par CTA). **B.** Peso fresco promedio de parte aérea por plántula (g.) a los 30 días de la siembra para el par VTA, VBr y VFV y los 50 días para el par CTA. La misma letra sobre las barras de cada par indica diferencias no significativas ($p \geq 0,05$). **VTA:** sustrato en base a vermicompost de estiércol de tambo; **VBr:** sustrato en base a vermicompost de frutas + verduras + cama de pollo tratado con bromuro de metilo; **VFV:** sustrato en base a vermicompost de frutas +verduras; **CTA:** sustrato en base a compost de estiércol de tambo. Todos los sustratos fueron elaborados con 50 % de vermicompost y 50 % ceniza de cáscara de arroz (v/v).

4.3 Actividad microbiana medida por hidrólisis de FDA

Se analizaron las actividades microbianas por hidrólisis de FDA, de los sustratos VTA, VBr y CTA (por motivos técnicos VFV no pudo ser analizado). En la figura 2 se aprecia que los sustratos presentaron actividades microbianas significativamente diferentes entre si, alcanzando VBr el mayor valor (valor de media: 50 μg FDA hidr. $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) seguido por VTA (valor de media: 39 μg FDA hidr. $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) y por último CTA (30 μg FDA hidr. $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$).

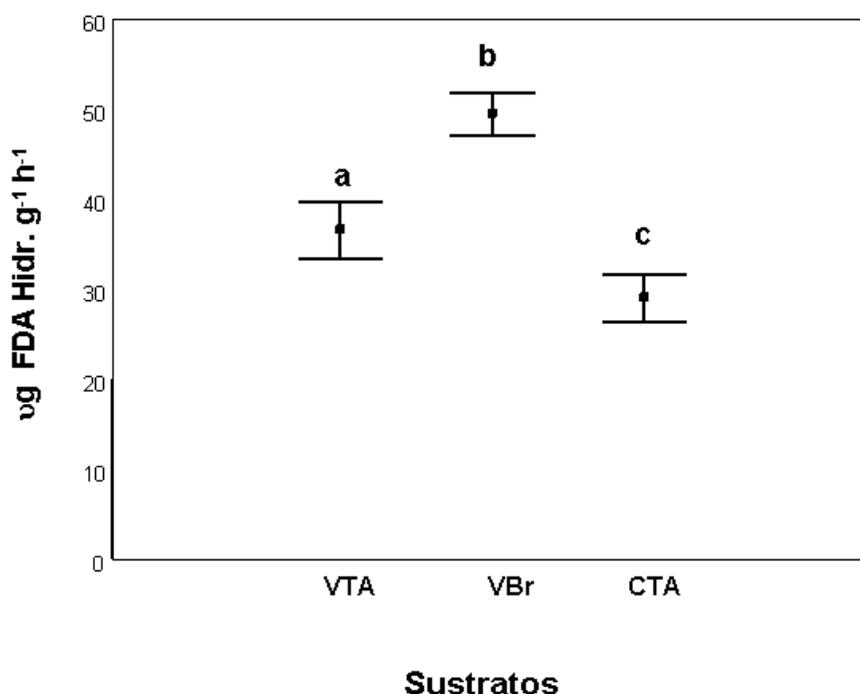


Figura 2. Hidrólisis de FDA (diacetato de fluoresceína), se indica los microgramos hidrolizados de FDA por hora por gramo de sustrato. ANOVA: $F(2,6)=42.77$, $p=0.0003$. Las diferentes letras indican valores significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). **VTA**: sustrato en base a vermicompost de estiércol de tambo; **VBr**: sustrato en base a vermicompost de frutas + verduras + cama de pollo tratado con bromuro de metilo; **VFV**: sustrato en base a vermicompost de frutas +verduras; **CTA**: sustrato en base a compost de estiércol de tambo. Todos los sustratos fueron elaborados con 50 % de vermicompost y 50 % ceniza de cáscara de arroz (v/v).

4.4 Análisis de la comunidad bacteriana por T-RFLP del ARNr 16S

Con el análisis de T-RFLP del producto de PCR del gen ARNr 16S derivado de los sustratos, se alcanzó a detectar un número máximo de fragmentos de restricción terminales (T-RFs) de 57 y un mínimo de 13, correspondientes a muestras de VTA y VBr respectivamente. Entre estos dos sustratos se obtuvieron diferencias significativas en el número de T-RFs observados, así como también en el índice de diversidad de Shannon e índice de riqueza de Margalef (tabla 3).

Debido a la heterogeneidad de las muestras fue necesario determinar cuales T-RFs eran relevantes para cada tratamiento. Para ello se realizó un análisis SIMPER, que determina cual es la contribución en porcentaje de un determinado T-RF a la similitud entre réplicas de una misma muestra. Estos T-RFs también son los más abundantes en dicha muestra y generalmente aportan al menos a un 5% de la abundancia total. En la tabla 4 se muestran los T-RFs predominantes y que aportan al menos a un 2 % a la similitud entre replicas.

4.5 Análisis multivariados de los datos de T-RFLP del ARNr 16S

Con los T-RFs que mostraron ser relevantes (aportan al menos un 5% a la abundancia total y al menos un 2% a la similitud entre réplicas, se llevaron a cabo análisis multivariados de cluster y de componentes principales (PCA). Como se aprecia en la figura 3 por encima de un 65 % de similitud las muestras VTA y VFV se agrupan quedando separadas de las muestras CTA y VBr, siendo estas últimas las más disímiles con el resto.

Tabla 3. Número de fragmentos de restricción terminales (T-RFs), valores de índices de riqueza, y diversidad, calculados a partir de los datos generados por T-RFLP del producto de amplificación del gen ARNr 16S.

Sustratos	S	d	H'
VTA	52,5 (\pm 7,1) a	6,9 (\pm 0,95) a	3,3 (\pm 0,17) a
VBr	24,25 (\pm 12,7) b	3,1 (\pm 1,7) b	2,4 (\pm 0,42) b
VFV	32,5 (\pm 16,3) ab	4,2 (\pm 2,17) ab	3,0 (\pm 0,38) ab
CTA	33 (\pm 5,9) ab	4,3 (\pm 0,8) ab	2,8 (\pm 0,17) ab

S= número de T-RFs detectados,; d= índice de Margalef; H'= índice de Shannon. Se muestra la media y desvío estándar correspondiente a cada índice. Valores seguidos por diferentes letras indican diferencias significativas, ($p \leq 0.05$).

Tabla 4. Análisis SIMPER. Abundancia promedio normalizada y contribución de los T-RFs más abundantes (en porcentaje) a la similitud entre las réplicas. Se indica por grupo de replicas el índice de similitud de Bray-Curtis. Se resaltan los T-RFs que se correlacionaron con grupos bacterianos que podrían estar implicados en el fenómeno de supresividad a *R. solani*.

T-RFs. (pb.)	Abundancia promedio normalizada	Contribución a similitud entre réplicas. (%)
Grupo VTA. Índice de simil. prom.:58,53		
64	172,99	15,09
62	248,32	13,77
91	82,43	6
203	87,01	5,76
85	83,18	5,37
76	69,07	4
208	48	3,83
80	72,29	3,72
83	96,99	3,45
205	69,68	3,22
211	37,33	2,54
88	44,05	2,15
175	32,8	2,08
374	25,47	2,06
198	28,51	2,03
Grupo VBr. Índice de simil. prom.:26,75		
62	297,81	29,15
76	110,11	13,17
80	217	10,2
83	126,77	6,76
64	209,39	6,38
208	87,4	5,08
108	83,16	4,04
91	37,74	4
203	43,48	3,91
78	86,1	3,69
Grupo VFV. Índice de simil. prom.:60,79		
76	274,14	19
64	153,11	13,45
95	136,38	10,83
85	90,09	7,05
62	122,57	6
211	78,08	5,73
91	64,9	5,2
208	59,01	4,41
116	52,43	4,02
88	35,43	3
67	93,7	2,68
104	43,1	2,61
205	33,16	2
Grupo CTA. Índice de simil. prom.:69,68		
76	422,45	29,76
91	199,18	14,17
62	224,58	13,65
88	111,24	7,22
67	103,72	6
85	91,47	5,89
214	43,91	2,27
203	41,05	2,09
235	49,74	2

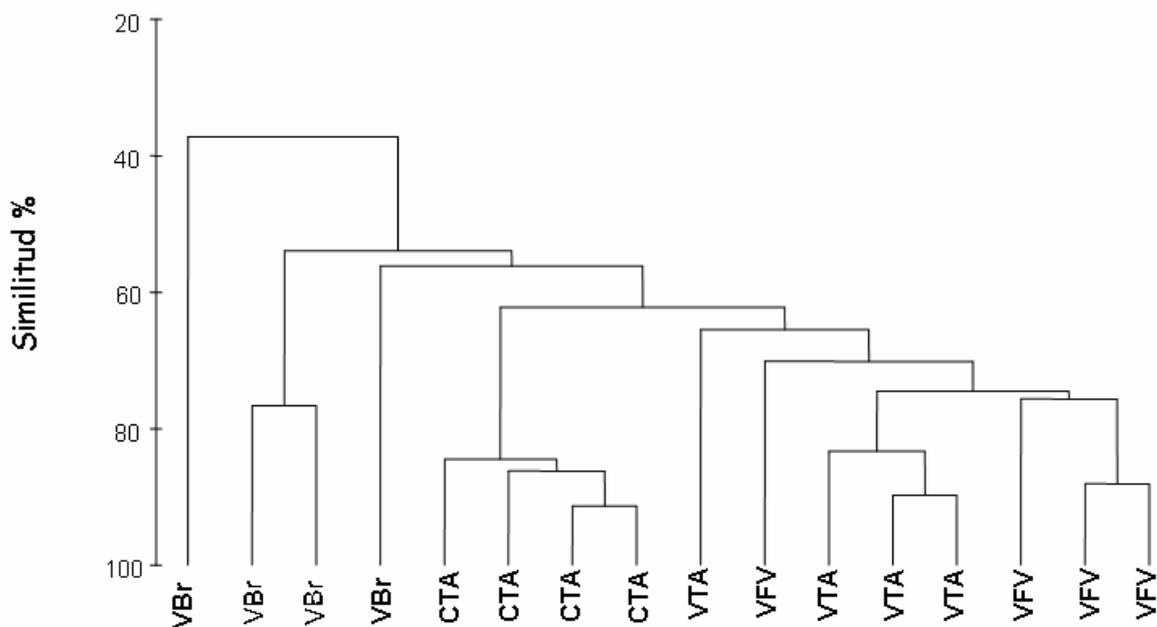


Figura 3. Análisis de cluster basado en índice de similitud de Bray-Curtis, utilizando la raíz cuadrada de las abundancias normalizadas de T-RFs seleccionados (tabla 3). **VTA**: sustrato en base a vermicompost de estiércol de tambo; **VBr**: sustrato en base a vermicompost de frutas + verduras + cama de pollo tratado con bromuro de metilo; **VFV**: sustrato en base a vermicompost de frutas + verduras; **CTA**: sustrato en base a compost de estiércol de tambo. Todos los sustratos fueron elaborados con 50 % de vermicompost y 50 % ceniza de cáscara de arroz (v/v).

En el análisis de PCA (figura 4A) se observa un patrón similar al anterior en donde las réplicas de VTA quedan próximas a VFV y alejadas de CTA y VBr. Estas últimas fueron las más disímiles entre si en ambos análisis.

En la figura 4B se observa un círculo de correlación que muestra la contribución de los T-RFs seleccionados a la ubicación de las réplicas en el plano del PCA. El vector de cada T-RF va en la dirección en que este incrementa su predominancia y el ángulo formado entre dicho vector de un T-RF y el de una replica brinda una idea de la correlación entre ambos.

Por lo tanto los T-RFs 64, 205 y 211, están correlacionados directamente con las replicas de sustrato VTA y VFV e inversamente correlacionado con CTA y VBr.

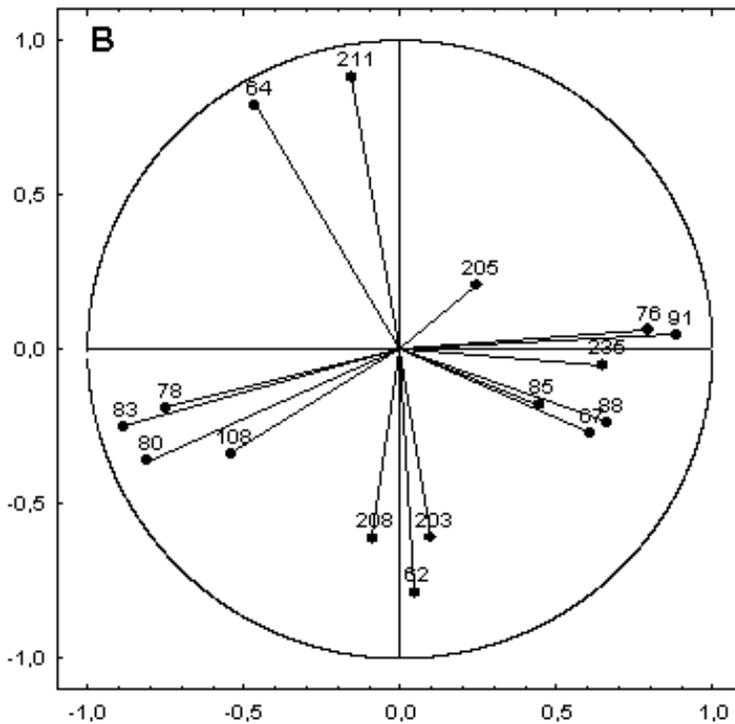
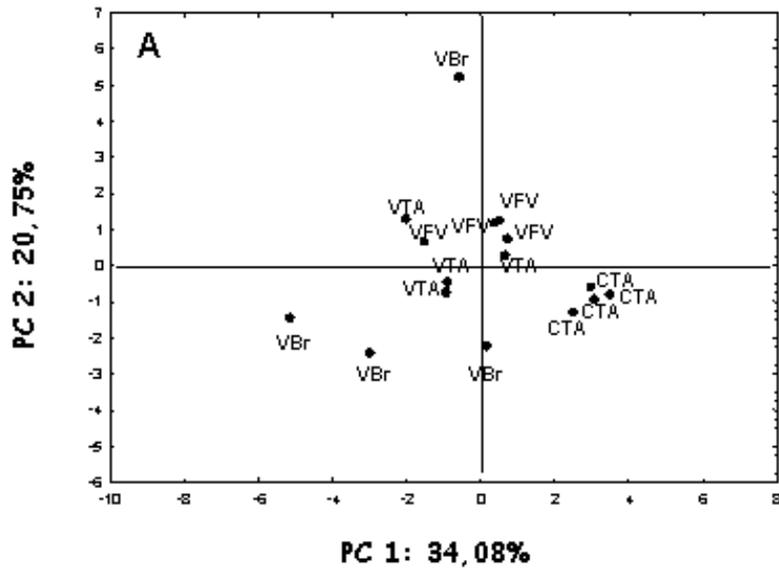


Figura 4. A. Análisis de componentes principales (PCA) utilizando la raíz cuadrada de las abundancias normalizadas de los T-RFs seleccionados. **B.** Círculo de correlación del PCA que muestra la contribución de los T-RFs seleccionados, a la ubicación y diferenciación de las muestras de sustratos en el mismo.

VTA: sustrato en base a vermicompost de efluentes de tambo; **VBr:** sustrato en base a vermicompost de frutas + verduras + cama de pollo tratado con bromuro de metilo; **VFV:** sustrato en base a vermicompost de frutas + verduras; **CTA:** sustrato en base a compost de efluentes de tambo. Todos los sustratos fueron elaborados con 50 % de vermicompost y 50 % ceniza de cáscara de arroz (v/v).

Los T-RFs 208, 203, 62, 78, 80, 83, 78 presentaron correlaciones directas con VBr. En cuanto a los T-RFs 67, 76, 85, 88, 91 y 235 se correlacionaron directamente con CTA y también con algunas de réplicas de VTA y VFV.

4.6 Estudio de la comunidad microbiana del sustrato VTA mediante librería del gen del ARNr de 16S

Dado que en el ensayo con plántulas de tomate y *R. solani* se determinó que el sustrato en base a vermicompost VTA resultó supresivo al patógeno, se realizó una librería genómica del gen del ARNr ribosomal 16S a partir de ADN genómico aislado de este sustrato. Se obtuvieron un total de 56 secuencias que se compararon con secuencias de bancos de datos (NCBI utilizando la herramienta Blast Search y RDP utilizando la herramienta RDP classifier). El resultado de esta comparación muestra una predominancia de organismos del Phylum Proteobacteria seguido de Bacteroidetes y Actinobacteria (tabla 5). Se construyó un árbol filogenético con secuencias representativas de los clones y las secuencias que presentaron mayor similitud. De acuerdo con estos resultados se obtuvo secuencias que presentaron alta homología con secuencias de representantes de los géneros: *Duganella*, *Janthinobacterium*, *Telluria*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* y *Pseudomonas* (Figura 4).

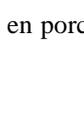
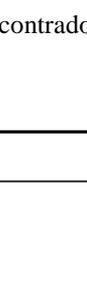
4.7 Identificación de los posibles organismos biocontroladores

Para poder identificar los microorganismos relacionados con la capacidad de supresión, se relacionó los T-RFs que mostraron la mayor predominancia y correlación en el PCA con los sustratos supresivos (VTA y VFV), con los posibles T-RFs obtenidos por restricción *in silico* utilizando el software MICA III (que utiliza la base de datos de

secuencias del RDP) y las secuencias obtenidas a partir de la librería genómica del sustrato VTA.

Como se puede apreciar en la tabla 6, los T-RFs asociados a los sustratos supresivos (64, 211 y 205) se pueden correlacionar con géneros de microorganismos involucrados en el control biológico de *R. solani*.

Tabla 5. Abundancias en porcentajes de Phyla encontrados en la muestra de sustrato VTA según el RDP classifier.

phylum	%	Library
Planctomycetes	3.6	
Gemmatimonadetes	1.8	
Acidobacteria	5.4	
Spirochaetes	1.8	
Deinococcus-Thermus	1.8	
OP10	1.8	
Actinobacteria	8.9	
Bacteroidetes	16.1	
Proteobacteria	42.9	
Unclassified Bacteria	16.1	

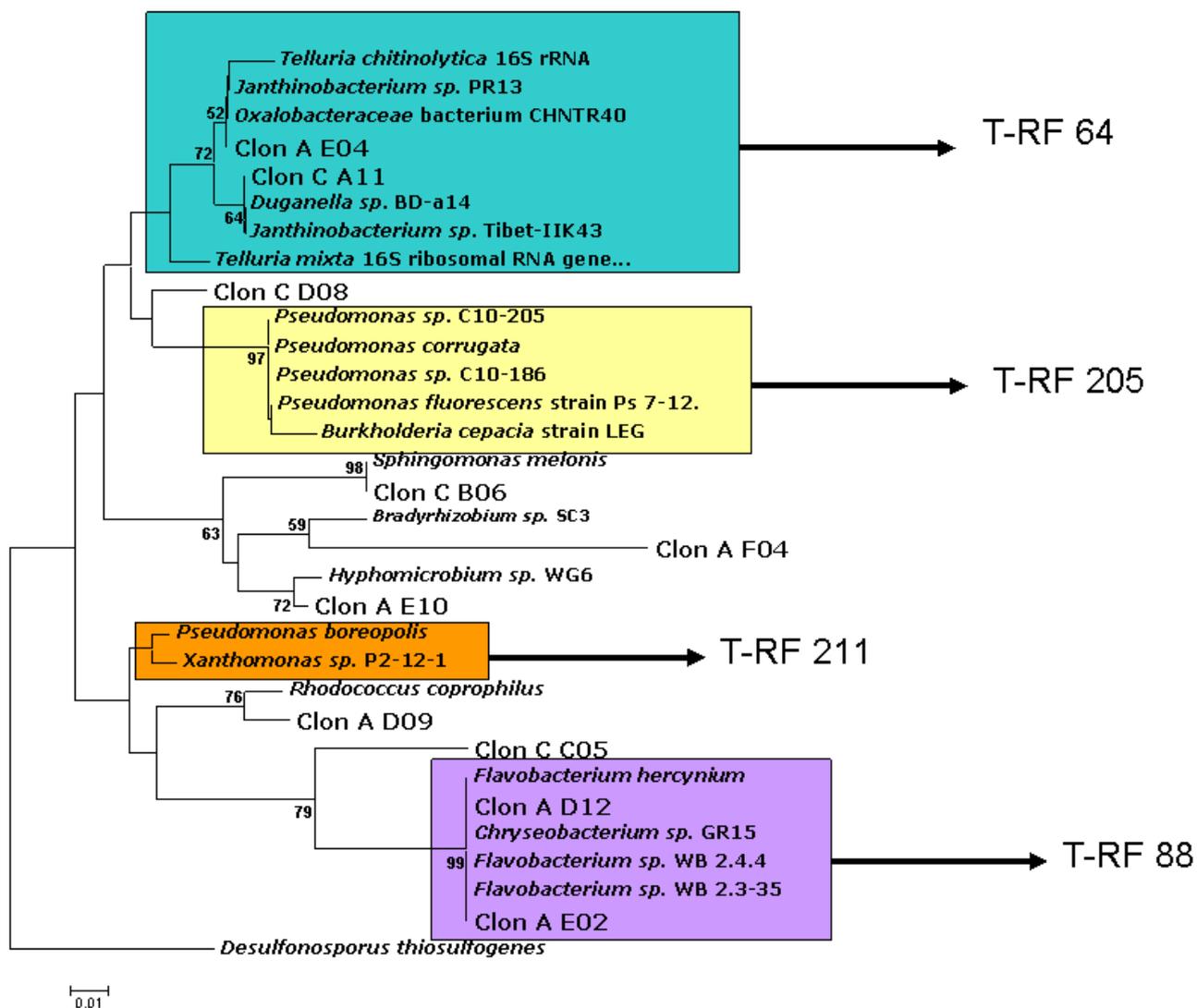


Figura 4. Árbol filogenético de consenso (500 réplicas), construido mediante el método de Neighbor-joining basado en algoritmos de Jukes-Cantor que muestra la posición de las secuencias del gen ARNr 16S de ADN aislado a partir del sustrato VTA y las correspondientes secuencias homologas obtenidas mediante un BLAST en Genbank. . Se muestra los valores de bootstrap que superan a un valor de 50%. Las secuencias derivadas de la muestra se nombran como “clon” seguido por su clave de identificación. Se indica el valor de T-RF esperado para los géneros enmarcados. La escala de las barras representa un valor de 0.01 de sustitución por posición de nucleótido.

Tabla 6. Correlación entre los T-RF de importancia en los sustratos supresivos y grupos bacterianos con posible actividad antagónica frente a *R. solani*. Se muestra los clones del sustrato VTA cuya secuencia genera los T-RF de importancia (el tamaño de los T-RF se calculó a partir de las secuencias por análisis de restricción *in silico* con la enzima *Hin6I*). Se muestra también los organismos que generaron esos tamaños de T-RF en el análisis de las secuencias del banco de datos RDP utilizando la herramienta on-line “Virtual digest” del software MiCAIII, Se resaltan los géneros que presentaron una alta homología con las secuencias de clones derivados del sustrato VTA.

T-RF(pb)	secuencia clonada con homología derivada del sustrato VTA	Grupos bacterianos
64-65*	clon C C06 clon A D06 clon AE04 clon C A11 clon A E04	<i>Burkholderia</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Legionella</i> sp., <i>Halorhodospira</i> sp., <i>Luteimonas</i> sp., <i>Ottowia</i> sp., <i>Variovorax</i> sp., <i>Schlegelella</i> sp., <i>Ralstonia</i> sp., <i>Cupriavidus</i> sp., <i>Thiomonas</i> sp., <i>Janthinobacterium</i> sp., <i>Duganella</i> sp., <i>Telluria</i> sp. , <i>Herbaspirillum</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Denitrobacter</i> sp.
88	clon A E02 clon A D12	<i>Flavobacterium</i> sp., <i>Chryseobacterium</i> sp. , <i>Cytophaga</i> sp., <i>Chlorobium</i> sp., <i>Anaeromyxobacter</i> sp., <i>Prosthecochloris</i> sp.
205*	-	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> spp. (<i>P. putida</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. corrugata</i> , <i>P. fluorescens</i>), <i>Wautersia</i> sp., <i>Cupriavidus</i> sp., <i>Azoarcus</i> sp., <i>Dechloromonas</i> sp., <i>Petrobacter</i> sp.,
208	-	<i>Burkholderia</i> sp. (<i>Burkholderia cepacia</i>), <i>Actinomyces</i> sp., <i>Chromohalobacter</i> sp., <i>Halomonas</i> sp., <i>Shewanella</i> sp., <i>Marinobacter</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Anoxybacillus</i> sp., <i>Brevibacillus</i> sp., <i>Catenibacterium</i> sp.
211*	clon C C03	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>), <i>Frateruia</i> sp., <i>Xanthomonas</i> sp. , <i>Lysobacter</i> sp., <i>Dyella</i> sp., <i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Neisseria</i> sp., <i>Legionella</i> sp. <i>Pseudomonas boreopolis</i>

* T-RFS con correlación directa en el PCA con los sustratos VTA y VFV.

5 Discusión

Dado que los sustratos en base a los vermicomposts VTA y VFV no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de plántulas viables y en peso fresco promedio de parte aérea en presencia o ausencia de inóculo de *R. solani*, estos fueron clasificados como supresivos; los restantes (VBr y CTA) fueron clasificados como conductivos. Para el caso de VBr su conductividad se puede explicar por el tratamiento al que fue sometido el vermicompost (1 a 2 meses)

previamente a su mezcla con ceniza de cáscara de arroz, dónde se le aplicó el biocida bromuro de metilo. Resultados similares se observaron con compost que fueron sometidos a un proceso de desinfección por acción térmica (Craft and Nelson, 1996). En cuanto al sustrato CTA, este fue elaborado con composts extraído de la zona superficial de una pila (windrow de 80 cm. de altura) de efluentes de tambo), con un período de maduración o curado de uno a dos meses. También para este caso se encontró una concordancia con la bibliografía; se reportó que un compost elaborado a partir de restos de hortalizas frutas y podas domiciliarias, adquirió una supresividad significativa a *R. solani* recién en un período de curado entre tres a siete meses (Tuitert et al., 1996).

Estos autores encontraron que no existe una correlación entre el grado de supresividad y la actividad microbiana medida por hidrólisis de FDA. Lo mismo se observó en el presente trabajo, ya que el sustrato VBr presentó el mayor valor y sin embargo mostró ser conductivo al patógeno. Inbar y colaboradores, 1991 y Craft y Nelson, 1996, demostraron que la actividad microbiana medida por hidrólisis de FDA tenía una correlación directa con la supresión del damping-off causado por *Pythium ultimum* y *P. graminicola* para el caso de ciertos tipos de composts. Chen et al. en 1988 postularon que la hidrólisis de FDA junto con la biomasa microbiana podían ser utilizadas como análisis predictivos de la supresividad a éstos patógenos, postulando que la supresión era del tipo “general” y el mecanismo de biocontrol está ligado a una competencia por nutrientes y exudados que liberan las raíces de las plántulas. Sugieren que una rápida degradación de estos compuestos por los microorganismos aportados por los compost evita la germinación de los propágulos del patógeno. Sin embargo en un trabajo posterior (Erhart et al., 1999) observó que no obtenía una correlación en la supresión al damping-off causado por *P. ultimum* en plántulas de un especie ornamental (*Lepidium sativum*) concluyéndose que estas variables son solo predictivas para el caso de ciertos tipos de

compost, como por ejemplo los obtenidos a partir de cortezas de árboles. De acuerdo con estos trabajos y nuestros resultados se concluye que la hidrólisis de FDA no presenta una correlación con la supresividad a *R. solani*.

Varios trabajos sugieren profundizar en el estudio de las comunidades microbianas con el objetivo de identificar grupos asociados al biocontrol.

En este aspecto, recientemente se observó que la incorporación de un compost a un suelo en condiciones de microcosmos, le confirió a éste supresividad a *R. solani* modificando la estructura de las comunidades fúngicas y bacterianas, estudiadas por T-RFLP de los genes ARNr 18S y 16S (hongos y bacterias respectivamente). Estos autores observaron un aumento significativo en la abundancia relativa de determinados T-RFs que provocó su diferenciación en un análisis de componentes principales (Perez-Piqueres et al. 2006)

En nuestro trabajo se analizó la estructura de la comunidad bacteriana utilizando datos generados por T-RFLP del ARNr 16 utilizando análisis multivariados, asumiendo el criterio de que los posibles T-RFs asociados a grupos involucrados en la supresividad a *R. solani*, debían de encontrarse entre los más abundantes (aportar al menos un 5% de la abundancia total) y entre los más representativos (aportar al menos un 2% a la similitud entre réplicas). Para esta selección se realizó el análisis SIMPER, que reveló que entre los T-RF-s que cumplieron este criterio se encontraron los esperados para posibles agentes de biocontrol identificados por análisis filogenético de una biblioteca genómica del gen del ARNr de 16S y mediante análisis de restricción *in silico* a partir de secuencias del banco de datos (tabla 4).

Los análisis multivariados realizados con los T-RFs seleccionados (cluster basado en índice de similitud de Bray-Curtis y PCA (figura 4), muestran que la estructura de las comunidades de los sustratos supresivos VTA y VFV presentan un mayor grado de similitud que con las del resto de los sustratos. Estos resultados sugieren que existe una

estructura comunitaria característica (fingerprint) correlacionada al fenómeno de supresividad a *R. solani*. Apoya esta hipótesis el hecho de que la similitud mencionada no dependió de la fuente de desecho empleada (VTA fue obtenido a partir de vermicompost de efluentes de tambo y VFV a partir de vermicompost de restos de frutas y hortalizas) mientras que el sustrato CTA obtenido a partir de compost de efluentes de tambo presentó un menor índice de similitud promedio con VTA. No se descarta que esto se pueda deber a que el compostaje y vermicompostaje son procesos distintos, y como se mencionó la acción de las lombrices tienden a aumentar selectivamente la abundancia de algunas especies bacterianas como las *Pseudomonas* (Schmidt et al., 1997) y a disminuir la abundancia de otras como *Salmonella* (Eastman et al., 2001). También pudo deberse a que el tiempo de maduración o curado del compost CTA tal vez no fue el suficiente como para lograr la colonización de una microflora supresiva (Erhart et al., 1999)

Por lo tanto esta hipótesis debe verificarse analizando las comunidades de otros sustratos a base de otros tipos de mezclas u otros materiales orgánicos. También sería de importancia analizar la correlación entre supresividad y la estructura de la comunidad fúngica, ya que como se mencionó Perez-Piquerez y colaboradores, observaron un cambio en la estructura de esta. Además se han encontrado agentes de biocontrol como *Trichoderma* y *Gliocladium* presentes en los composts (Kuter et al., 1983).

Por otro lado el sustrato en base al vermicompost tratado con biocida, mostró la menor similitud con el resto y la mayor variabilidad entre réplicas. Esto puede deberse a que los nutrientes liberados al morir la biomasa microbiana original, permitieron una recolonización del mismo y la sucesión de especies que se dio en cada bandeja (cuatro réplicas) pudo ser distinta. Dicha recolonización del sustrato pudo ser estimulada por su alto contenido en nutrientes (tabla 2) y por presentar materia orgánica capaz de degradarse, dado el significativo valor alcanzado en la hidrólisis de FDA (figura 2).

El análisis de PCA también reveló que los T-RFs 64, 205 y 211 son responsables de la diferenciación de los sustratos VTA y VFV del resto. Utilizando la herramienta on-line “Virtual digest” del software MiCAIII, se obtuvo una lista de candidatos que poseen dichos T-RFs para la enzima utilizada. Entre estos se encontraron géneros de bacterias con capacidad biocontroladoras a *R. solani*. Para el fragmento 64 se encontraron miembros de la familia *Oxalobacteraceae*, y el género *Burkholderia*. El T-RF 205 se corresponde a varias especies de *Pseudomonas*, reconocidas como agentes de biocontrol como *P. putida*, *P. corrugata* y *P. fluorescens* entre otros. Finalmente para el T-RF 211 se observó en la lista a *Pseudomonas boreopolis*, *Xhantomonas* sp. y *Stenotrophomonas maltophilia* (*Xhantomonas maltophilia*). Como se mencionó éste fue uno de los agentes de biocontrol más eficaces al patógeno encontrados en los composts (Hoitink and Fahy, 1986). Esta especie posee cepas con síntesis de diferentes moléculas con acción antifúngica, como por ejemplo la producción de quitinasas (Zhang and Yuen, 2000) y antibióticos (Jakobi et al., 1996).

En otro trabajo recientemente publicado se estudió los efectos de diferentes estrategias de manejo orgánico sobre la comunidad bacteriana en un suelo (previamente explotado en forma convencional), buscando una correlación entre esta y la supresividad al damping-off causado por *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum* y *Phytophthora sojae*. Se encontró que determinadas prácticas agrícolas como el agregado de compost provocaron la mayor supresividad, y siguiendo un criterio de selección de T-RFs similar al utilizado en el presente trabajo, se llegó a correlacionar esta supresividad con cuatro T-RFs predominantes (137, 139, 141 y 148 para la enzima *MspI*), obteniéndose para estos una correlación cuantitativa entre la abundancia de estos y el grado de supresividad del damping-off (Benitez et al, 2007). La correlación de estos T-RFs con secuencias del banco de datos (llevada a cabo por análisis de restricción *in silico* con el software MICAIIII), determinó que

entre los géneros hallados, se encontraban algunos que poseían especies biocontroladoras de los patógenos.

En nuestro trabajo no se pudo determinar una correlación cuantitativa entre T-RFs y porcentaje de plántulas viables, ya que solo se contó con cuatro réplicas para cada ensayo (siendo necesario para esto al menos cinco). Sin embargo, el análisis filogenético de las secuencias clonadas con secuencias obtenidas en NCBI, reveló homologías con géneros bacterianos que poseen especies cuyo rol antagonista a *R. solani* fue previamente reportado. Uno de éstos fue el género *Flavobacterium*, que como se mencionó posee especies muy eficaces como *F. balustinum* (Hoitink and Fhay, 1986, Tunlid et al., 1989). Dentro de la misma familia (*Flavobacteraceae*) también se encontró al género *Chryseobacterium* que posee especies antagonistas como *C. gleum* (Krause et al., 2001). Organismos de este género son muy abundantes en ambientes ricos en materia orgánica (como los composts, Ryckeboer et al., 2003). Recientemente se determinó que estos organismos son colonizadores primarios de las semillas en germinación, y que posteriormente colonizan la superficie de la raíz de la plántula emergente (Green et al., 2006). Sin embargo dado que este grupo carece de motilidad existen otras especies que por competencia pueden ocasionar su exclusión de la superficie radicular. Se demostró además que la presencia de compost en el sustrato favorece su persistencia, concluyéndose que esta no se correlaciona con compuestos rizosféricos derivados de la plántula (exudados radicales, etc), sino mas bien a los nutrientes aportados por el compost (Green et al., 2007).

En los trabajos de Green y colaboradores se encontró también que otras de las especies que persisten en la superficie radical de las plántulas en desarrollo, son miembros de la familia *Oxalobacteraceae* (phylum Proteobacteria), como *Telluria mixta* *T. chitinolytica* y *Duganella* sp., siendo en este caso influenciada dicha persistencia por compuestos rizosféricos derivados de la plántula. Los miembros de la familia

Oxalobacteraceae son bacterias móviles, capaces de degradar una gran variedad de moléculas orgánicas incluyendo la quitina (Bowman et al. 1988, Spiegel et al., 1991). Dichas características las hacen candidatas como agentes de biocontrol de *R. solani*. En el presente trabajo se observó una gran dominancia de las Proteobacterias en las secuencias clonadas (tabla 5). Entre estas, las de varios clones se correlacionaron con grupos de la familia *Oxalobacteraceae* como *Duganella* sp. y *Telluria* sp. (Tabla 6). Otras secuencias también se agruparon con la secuencia correspondiente a *Janthinobacterium* sp., también perteneciente a dicha familia, habiéndose demostrado recientemente que una cepa de la especie *J. lividum* presentó la mayor actividad de enzimas con capacidad de lisis de la pared celular de varios hongos incluido *R. solani* entre varios aislamientos (Cruz et al., 2008).

El análisis filogenético también reveló homología entre la secuencia de un clon y la secuencia correspondiente a la especie *Pseudomonas boreopolis*. Para organismos de esta especie se demostró un mecanismo indirecto de biocontrol a *R. solani*. Cuando esta fue inoculada en un sustrato a base de bagazo de semillas de *Brassica*, la acción de una enzima producida por la bacteria degradó un compuesto presente en dicho bagazo (sinirgina), liberándose compuestos volátiles con actividad antifúngica (Chung et al., 2003). En este grupo filogenético también se encuentran organismos del género *Xanthomonas*, que como ya se discutió poseen mecanismos directos de biocontrol.

El rol en el biocontrol a *R. solani* de los grupos encontrados en el presente trabajo deberá ser confirmado por otros análisis. Sería interesante aislar estos organismos y verificar por un lado el tamaño de T-RF esperado de acuerdo a la secuencia del gen ARNr 16S y por otro lado estudiar *in vitro* e *in vivo* los mecanismos de biocontrol y la eficacia de éstos.

Los aislamientos también permitirán encontrar cepas que pueden ser utilizadas para inoculación o bioaumentación durante un proceso de compostaje o vermicompostaje, con el fin de potenciar la supresividad y

la promoción del crecimiento vegetal en sustratos para producción de plántulas en contenedor.

6 Conclusiones:

En este trabajo se demostró que el agregado de algunos vermicomposts promueve la supresión del damping-off causado por *R. solani* en plántulas de tomate. Esta supresión está asociada a la presencia de determinados microorganismos con capacidad biocontroladora y no está asociada a la actividad microbiana estimada por hidrólisis de FDA.

Será necesario realizar mas estudios para determinar cuales son las condiciones de producción de un vermicompost o compost (material orgánico empleado, manejo operativo, tiempo de maduración o curado, etc.) que favorecen la presencia de estos microorganismos biocontroladores.

7 Bibliografía

Abad, M. 1991. Los sustratos hortícolas y las técnicas de cultivo sin suelo. La horticultura española en la CEE. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Córdoba.271-280.

Avilés, M., Tello, J. 1995. El compostado de los residuos orgánicos. Su relación con las enfermedades de las plantas. En "Agroecología y Desarrollo". Ediciones Mundi-Prensa. Universidad de Extremadura. 185-215.

Baker, K.F., Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman. San Francisco.

Benítez, M.S., Tustas, F.B., Rotenberg, D., Kleinhenz, M.D., Cardina, J., Stinner, D., Miller, S.A., McSpadden, G. 2007. Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the

application of different organic field management strategies. *Soil Biol. Biochem.* 39. 2289-2301

- Bohem, M., Madden, L., Hoitink, H.** 1993. Effect of organic matter decomposition level on bacterial species diversity and composition in relationship to *Pythium* damping-off severity. *Appl. and Env. Microbiol.* 59 (12), 4171-4179.
- Bowman, J.P., Sly, L., Hayward, A.C., Spiegel, Y., Stackebrau, E.** 1993. *Telluria mixta* (*Pseudomonas mixta* Bowman, Sly and Hayward 1998) gen. nov., comb. Nov., and *Telluria chitinolytica* sp. Nov., soil dwelling organisms which actively degrade polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43.120-124.
- Chan, P.L.S., Griffiths, D.A.** 1988. The vermicomposting of pretreated pig manure. *Biol. Wastes.* 24. 57-69.
- Chaoui, H., Edwards, C.A., Brickner M.** 2002. Suppression of the plant diseases, *Pythium* (damping-off), *Rhizoctonia* (root rot) and *Verticillium* (wilt) by vermicomposts. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference Pest and Diseases. Vol. II 8B-3: 711-716.
- Chen, W., Hadar, Y.** 1987. Composting and use of agricultural wastes in container media. *Compost: Production quality and use.* Elsevier Applied Science, London. 71-77.
- Chen, W., Hoitink, H.A., Madden, L.V.** 1988. Microbial activity and biomass in container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopatol.* 78. 1447-1450.
- Chung, W.C, Huang, J.W., Huang, H.C., Jen, J.F.** 2003. Control by *Brassica* seed pomace combined with *Pseudomonas boreopolis*, of damping-off of watermelon caused by *Pythium* sp. *The Canadian J. Plant Pathol.* 25. 285-294.
- Chung, Y. R., Hoitink, H., Lipps, P.E.** 1988. Interactions between organic-matter decomposition level and cellulose amendment on the inoculum potential of *Rhizoctonia solani* in hardwood bark media. *Phytopatol.* 80. 73-77

- Clarke, K.R., Warwick, R.M.** 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. 2nd edition: Plymouth Marine Laboratory, PRIMER-E, Plymouth, UK, 172pp.
- Craft, C.M., Nelson, E.B.** 1996. Microbial properties of composts that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1550-1557.
- Cruz, A.F., Horii, S., Ochiai, S., Yasuda, A., Ishii, T.** 2008. Isolation and analysis of bacteria associated with spores of *Gigaspora margarita*. *Journ. Appl. Microbiol.* 3. 423-428.
- De Brito Alvarez, M., Gagne, S., Antoun, H.** 1995. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of Plant Growth-Promoting Rhizobacterias. *Appl. and Env. Microbiol.* 61 (1), 194-199.
- Dunbar, J., Lawrence, O., Kuske, C.** 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *Appl. and Env. Microbiol.* 66 (7), 2943-2950
- Eastman, B.R., Kane, P.N., Edwards, C.A., Trytek, L., Gunadi, B., Stermer, A.L., Mobley, J.R.** 2001. The effectiveness of vermiculture in human pathogen reduction for USEPA biosolid stabilization. *Compost Sci. Util.* 9. 38-49.
- Erhart, E., Burian, K., Hartl, W., Stich, K.** 1999. Suppression of *Pythium ultimum* by biowaste composts in relation to compost microbial biomass, activity and content of phenolic compounds. *Phytopathol.* 147. 299-305.
- Green, S., Inbar, E., Frederick C.M. Hadar, Y., Minz, D.** 2006. Succession of bacterial communities during early plant development: transition from seed to root and effect of compost amendment. *Appl. and Env. Microbiol.* 72. 3975-3983.
- Green, S., Frederick C.M, Hadar, Y., Minz, D.** 2007. Contrasting patterns of seed and root colonization by bacteria from the genus *Chryseobacterium* and from the family *Oxalobacteraceae*. *The ISME Journal.* 1. 291-299.

- Hartenstein, R., Bisesi, M.S.** 1989. Use of earthworms biotechnology for the management of effluents from intensively housed livestock. *Outlook Agric.* 18. 3-7.
- Hartenstein, R., Hartenstein, F.** 1981. Physicochemical changes in activated sludge by the earthworm *Eisenia foetida*. *J. Environ. Qual.* 10. 377-382.
- Hoitink, H. and Fahy, P.** 1986. Basis for the control of soil-borne plant pathogens with composts. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24. 93-114.
- Huber, D.M., Schneider, R.W.** 1982. The description and occurrence of suppressive soils. "Suppressive soil and plant disease". APS Press. St. Paul. Minnesota. 1-7.
- Inbar, Y., Boehm, M.J., Hoitink, H.A.** 1991. Hydrolysis of fluorescein diacetate in sphagnum peat container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Soil. Biol. and Biochem.* 23. 479-483.
- Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., Kempter, C., Jung, G., Berg, G., Bahl, H.** 1996. Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R 3089. *The Journal of Antibiotics.* 49. 1101-1104.
- Krause, M.S., Madden, L.V., Hoitink, H.A.** 2001. Effect of potting mix microbial carrying capacity on biological control of *Rhizoctonia* damping-off of radish and *Rhizoctonia* crown and root rot of *Poinsettia*. *Phytopathol.*
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M.** 1994. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* 10. 189-191.
- Kuter, G.A., Nelson, E.B. Hoitink, H.A., Madden. L.V.** 1983. Fungal populations in container media amended with composted hardwood bark suppressive and conducive to *Rhizoctonia* damping-off. *Phytopathol.* 73. 1450-1456.
- Lumsden, R.D., Lewis, J.A., Millner, P.D.** 1983. Effects of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. *Phytopathol.* 73. 1543-1548.

- Mandelbaum., R., Hadar, Y., Chen, Y.** 1988. Effect of heat treatment on suppression of *Pythium pahanidermatum* and microbial activities in substrates containing compost. *Biol. Wastes.* 26. 261-274.
- Mitchell, M.J., Hornor, S.G., Abrams., B.I.** 1980. Decomposition of sewage sludge in drying beds and the potential role of the earthworm *Eisenia foetida*. *J. Environ. Qual.* 9. 373-378.
- Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C.** 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biol. Biochem.* 38.460-470.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J.** 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating process. *Ann. Microbiol.* 53. 349-410.
- Schnürer, J., Rosswall, T.** 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. and Env. Microbiol.* 43, 1256-1261.
- Spiegel, Y., Cohn E., Galper, S., Sharon, E., Chet, I.** 1991. Evaluation of a newly isolated bacterium, *Pseudomonas chitinolytica* sp nov. for controlling the root-knot nematode, *Meloydogine javanica*. *Biocontrol Sci. Technol.* 1. 115-125,
- Tuitert, G., Szczech, M., Bollen, G.J.** 1998. Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with composts made from organic household waste. *Phytopatol.* 88. 764-773.
- Tunlid, A., Hoitink, H.A., Low, C., White, D.C.** 1989. Characterization of bacteria that suppress *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media by analysis of fatty acid biomarker. *Appl. Environ Microbiol.* 55. 1368-1374.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology.* 173. 697-703.
- Zhang, Z., Yuen, G.Y.** 2000. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopatol.* 90. 384-389.

Resultados complementarios



1 Introducción

En el presente anexo de resultados complementarios, se estudió la comunidad bacteriana mediante análisis de T-RFLP del gen del ARNr 16S de muestras de sustratos previos a su utilización en el crecimiento de plántulas. Parte de estos análisis fueron realizados en el Centro de Ecología Microbiana de la Universidad Estatal de Michigan (EE.UU.) en el año 2003, cuando aún en nuestro país no se había puesto a punto este tipo de análisis. Para una de las muestras analizada por dicho método (CVRU40%), se llevó a cabo un ensayo de supresión a *Rhizoctonia solani* en almácigo de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. perita).

Se analizó también el perfil T-RFLP del ARNr 16S de una muestra del vermicompost (de efluentes de tambo) empleado para elaborar el sustrato VTA, previo a ser mezclado con ceniza de cáscara de arroz y ser utilizado en el ensayo con las plántulas de tomate descrito en el capítulo anterior

Los resultados mostrados en este anexo no pudieron ser incluidos en el capítulo anterior, dado que parte de ellos no fueron obtenidos en las mismas condiciones experimentales del mencionado capítulo. Sin embargo contribuyen a la confirmación de las hipótesis planteadas en dicho capítulo 2 y nos permitió estudiar si existe una correlación a priori (previo a su utilización como sustrato para crecimiento de plántulas) entre la estructura de la comunidad de un vermicompost o un sustrato en base a éste y el fenómeno de supresividad a *R. solani*.

2 Materiales y métodos

2.1 Ensayos de supresividad a *R.solani* en almácigos de plántulas de tomate

El ensayo de supresividad a *R. solani* en almácigos de plántulas de tomate (cv. Perita) fue realizado en las mismas condiciones (fotoperíodo,

humedad relativa y temperatura ambiente) ya descritas en el capítulo anterior y con la misma cepa de hongo. En la tabla 1 se resumen las mezclas utilizadas. Estas fueron en base a vermicompost de rúmen vacuno (obtenido por un sistema de producción de lecho a escala de campo) y ceniza de cáscara de arroz.

Los controles consistieron en utilizar directamente como sustrato a la ceniza de cáscara de arroz con y sin inóculo del patógeno, con el fin de determinar si el soporte utilizado para elaborar los sustratos con el agregado de vermicompost (ceniza de cáscara de arroz) es conductivo o no al patógeno. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado.

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA seguido por test de Tukey (HSD)

2.2 Obtención de los perfiles T-RFLP del ARNr 16S

Para la obtención del perfil T-RFLP del ARNr 16S de la muestra VTAP, la cual corresponde al vermicompost utilizado para elaborar el sustrato VTA (efluentes de tambo) previo a su utilización para el ensayo de crecimiento de plántulas de tomate, se empleó el mismo procedimiento descrito en el capítulo anterior.

El perfil T-RFLP del ARNr 16S de la muestra de sustrato CVRU40% (sustrato elaborado con una mezcla de 40% de vermicompost de rúmen vacuno y 60% de ceniza de cáscara de arroz v/v) tomada previamente al ensayo de crecimiento de plántulas de tomate, fue obtenido en el Centro de Ecología Microbiana de la Universidad Estatal de Michigan (EE.UU). Pero en este caso se utilizó la enzima de restricción *HhaI* (Fermentas Life Science), que reconoce la misma secuencia que *Hin6I* (5'GCGC3') pero corta la secuencia dos bases más hacia el extremo 3', por lo tanto para poder comparar los cromatogramas se alinearon, restando dos bases a los valores de T-RFs.

2.3 Análisis de Componentes Principales (PCA) con datos del T-RFLP del ARNr 16S

Los valores de abundancia de los T-RFs obtenidos fueron normalizados a los valores de abundancia total de la matriz de datos del T-RFLP de los sustratos analizados en el capítulo anterior (VTA, VFV, VBr y CTA).

Para realizar el análisis de componentes principales (PCA), fueron seleccionados los fragmentos de restricción terminales (T-RFs) correspondientes de las muestras complementarias que cumplieron con el criterio utilizado en el estudio anterior (análisis SIMPER), es decir aquellos que son abundantes y representativos. Se realizó por lo tanto, un análisis de componentes principales incluyendo las muestras de este capítulo, junto con las muestras del estudio presentado en el capítulo anterior.

Tabla 1. Sustratos utilizados en ensayos de supresividad frente a *R. solani*.

Sustratos	Composición de mezcla
Ca	ceniza de cáscara de arroz
CAVRU20%	mezcla de: 80% de ceniza de cáscara de arroz + 20% de vermicompost de rumen vacuno (v/v)
CAVRU40%	mezcla de: 60% de ceniza de cáscara de arroz + 40% de vermicompost de rumen vacuno (v/v)

3 Resultados

3.1 Ensayos de supresividad a *R. solani* en almácigos de tomate

En la figura 2 se muestra el resultado del ensayo de supresividad frente a *R. solani* en almácigos de tomate (cv. Perita) en dónde se observa que la ceniza de cáscara de arroz inoculada con el hongo presentó una cantidad significativa de plántulas de tomate con síntomas de damping-off post-emergente, seguido por el sustrato con una mezcla de 20% de vermicompost de rúmen (CVRU20%H). Finalmente la mezcla con un 40 % de vermicompost (CVRU40%H) y la ceniza sin inóculo (Ca) presentaron un número escaso de plántulas enfermas.

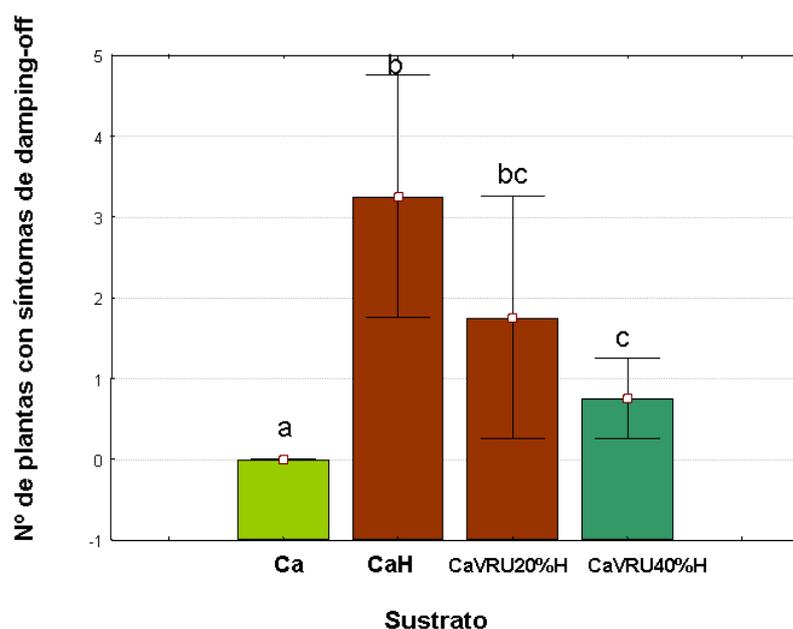


Figura 1. Ensayo de supresividad frente a *R. solani*. Se indica el número de plantas con síntomas de damping-off post-emergente. Columnas seguidas por diferentes letras indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$). Ca: ceniza cáscara de arroz sin inóculo de *R. solani* (control), CaH : ceniza de cáscara de arroz inoculada con *R. solani*. CaVRU20% H: mezcla (sustrato) con 20% de vermicompost de rúmen y 80% de ceniza de cáscara de arroz (v/v) inoculada con *R. solani*. CaVRU40%H: mezcla (sustrato) con 40% de vermicompost de rúmen y 60% de ceniza de cáscara de arroz (v/v) inoculada con *R. solani*.

3.2 Análisis de PCA con datos del T-RFLP del ARNr16S

En la figura 3 se muestra el resultado del análisis de PCA con las abundancias relativas de los T-RFs seleccionados (por ser abundantes y representativos) a partir del perfil T-RFLP de las muestras obtenidas en el presente trabajo complementario (CVRU40% y VTAP, las cuales fueron tomadas previamente al ensayo de supresividad correspondiente) junto con las muestras analizadas en el capítulo 2. (VTA, VFV; VBr y CTA). Como se puede observar las muestras CVRU40% y VTAP se ubican cercanamente las muestras de los sustratos supresivos VTA y VFV, quedando distantes a las de los no supresivos (VBr y CTA). Nuevamente los T-RFs 64, 205 y 211 fueron los responsables en la diferenciación de las muestras.

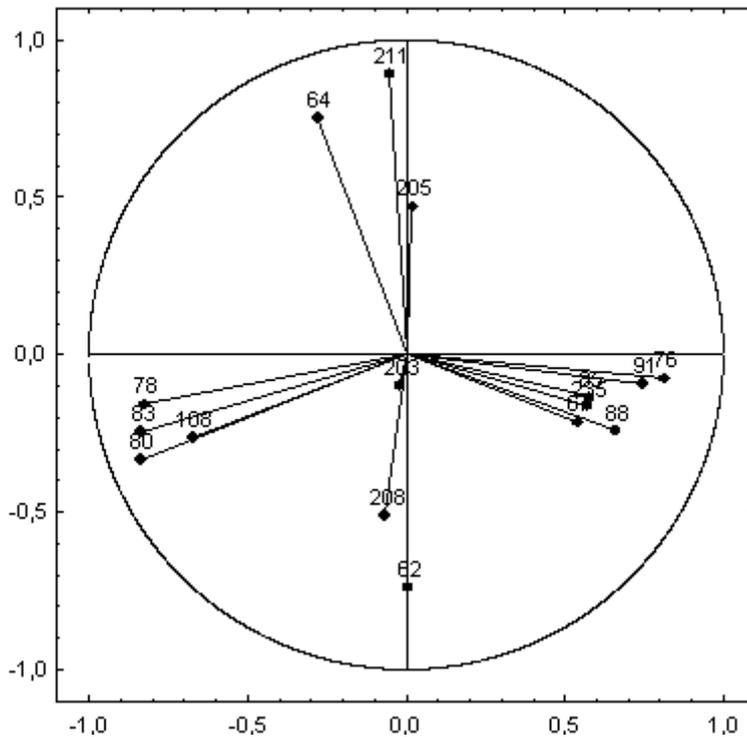
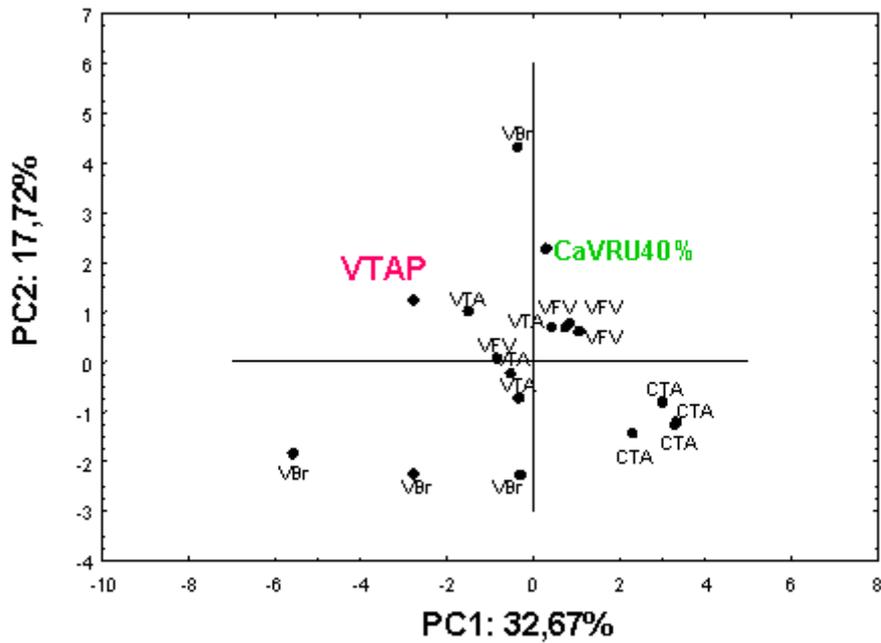


Figura 3. **A.** Análisis de componentes principales (PCA) utilizando las abundancias normalizadas de los fragmentos de restricción terminales (T-RFs) seleccionados. **B.** Círculo de correlación del PCA que muestra la contribución de los T-RFs seleccionados, a la ubicación y diferenciación de las muestras de sustratos en el mismo. **VTA:** sustrato en base a vermicompost de efluentes de tambo; **VBr:** sustrato en base a vermicompost de frutas + verduras + cama de pollo tratado con bromuro de metilo; **VFV:** sustrato en base a vermicompost de frutas +verduras; **CTA:** sustrato en base a compost de efluentes de tambo. **CaVRU40%:** mezcla con 40% de vermicompost rúmen y 60% de ceniza de cáscara de arroz (v/v). **VTAP:** muestra de vermicompost utilizado para elaborar el sustrato VTA (obtenido a partir de efluentes de tambo), previo a su uso para el crecimiento de plántulas de tomate.

4 Discusión

El análisis de PCA muestra que las muestras estudiadas en este trabajo complementario se agruparon con las muestras de VTA y VFV que fueron definidas como supresivas previamente.

En dicho análisis se confirma una vez más que los T-RFs 64, 205 y 211 son los responsables de la diferenciación de las muestras.

Nuevamente se observa una agrupación de las muestras supresivas al patógeno diferenciándose de las no supresivas y esto refuerza la hipótesis de la existencia de una estructura de comunidad bacteriana característica de los sustratos supresivos. Se confirma también la importancia de determinados T-RFs. Éstos fueron previamente comparados con los correspondientes a géneros bacterianos capaces de actuar como agentes de biocontrol y son los que más contribuyen a la diferenciación en el análisis de componentes principales. Los T-RFs 205 y 211 corresponden a los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (o *Stenotrophomonas*), como ya fue discutido, ha sido previamente demostrado para especies de estos géneros que producen compuestos antifúngicos como antibióticos y otros y pueden actuar en el biocontrol del patógeno.

Otro resultado a destacar es que las muestras analizadas en la presente sección fueron tomadas previamente a los ensayos y no al final de estos como en el caso de las muestras anteriores, sin embargo, presentaron similitud en la composición de la comunidad microbiana con las muestras tomadas luego del ensayo de supresión. Esto indica la importancia del aporte de los microorganismos que se desarrollan en el proceso de vermicompostaje o compostaje en la capacidad de supresión a patógenos. Se puede observar también que las comunidades microbianas de la muestra de VTAP (vermicompost de efluentes de tambo sin mezcla con la ceniza de cáscara de arroz) y la muestra VTA (tomada luego de la utilización en el ensayo de supresión) se agruparon en el análisis de PCA, este resultado demuestra que el aporte de microorganismos del compost persiste durante el ensayo de supresión.

5 Conclusiones

Este estudio complementario confirma que algunos productos compostados promueven el desarrollo de determinados microorganismos beneficiosos para el crecimiento vegetal. Sería posible entonces analizar la comunidad microbiana mediante una técnica rápida (como T-RFLP) y detectar la presencia de determinados microorganismos que sean indicadores de la capacidad supresiva a patógenos. La matriz de datos T-RFLP generada en estos estudios podría funcionar como un “standard” para analizar la estructura de la comunidad bacteriana de un determinado sustrato. La presencia de determinados T-RFs (como 64, 205 y 211 detectados en este trabajo) podría ser utilizada como indicadores correlacionados a la supresividad frente a *R. solani* en almácigos de plántulas. Como se discutió previamente, es necesario continuar este trabajo (analizando mas muestras y utilizando otros métodos que permitan confirmar la capacidad de supresión de estos microorganismos) para poder confirmar esta hipótesis.



Conclusiones generales



En el presente trabajo se propuso estudiar las comunidades bacterianas de diversos materiales compostados (obtenidos a partir de distintos materiales orgánicos de desecho y con diferentes manejos productivos), para correlacionar a éstas con propiedades de promoción de crecimiento vegetal y supresividad a fitopatógenos.

Para ello se estudió primeramente el efecto de la incorporación de diversos vermicomposts sobre la comunidad bacteriana de un suelo de invernáculo en producción de tomate, analizado por Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) del gen ARNr 16S. Se observó un incremento significativo en el peso promedio de frutos cosechados causado por el agregado de ciertos tipos de vermicompost. Dicho efecto mostró no estar solo correlacionado con los nutrientes totales aportados por las enmiendas, sino también con los aspectos microbiológicos, como la actividad microbiana y el aumento de la abundancia relativa de Fragmentos de Restricción Terminales (T-RFs), correspondientes a géneros bacterianos que poseen especies con capacidad de promoción del crecimiento vegetal como *Pseudomonas* sp y *Pantoea* sp. Por lo tanto se concluye que el agregado de ciertos tipos de vermicomposts sometidos a un determinado período de maduración, puede estimular el crecimiento y productividad vegetal no solo mejorando las propiedades físico-químicas del suelo, sino además provocando el aumento en la abundancia de microorganismos benéficos.

Otro resultado relevante observado sugiere que las enmiendas pueden revertir las perturbaciones sobre la comunidad microbiana del suelo causadas por la aplicación de agroquímicos como el Carbofurán, dado que la estructura de la comunidad bacteriana de suelo sin la aplicación de éste agroquímico presentó una mayor similitud con la de suelo con dicha aplicación y con posterior agregado de vermicomposts, diferenciándose de la comunidad del suelo con aplicación de dicho agroquímico pero sin el agregado de enmiendas.

Posteriormente se estudió las comunidades bacterianas por T-RFLP del ARNr 16S de diversos sustratos elaborados en base a diferentes vermicomposts y con diferencias en la supresividad al damping-off causado por *Rhizoctonia solani* en plántulas de tomate.

Se observó que la estructura de las comunidades bacterianas de los sustratos en base a vermicomposts y otros materiales orgánicos compostados que mostraron ser supresivos, presentan mayor similitud entre si que con las correspondientes a los no supresivos, demostrándose la existencia de la correlación buscada.

En una librería genómica del gen ARNr 16S a partir de una muestra de un sustrato supresivo, se observó la presencia de secuencias que estaban filogenéticamente relacionadas con secuencias pertenecientes a grupos bacterianos con capacidades biocontroladoras, encontrándose: *Janthinobacterium*, *Duganella*, *Telluria* (miembros de la familia *Oxalobacteraceae*); *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* (familia *Flavobacteraceae*); *Pseudomonas*; *Stentrophomonas* y *Xanthomonas*.

Análisis de restricción *in silico* mostraron que los T-RFs esperados para estos géneros estaban presentes en los perfiles T-RFLP de los sustratos, y que los correspondientes a los géneros de la familia *Oxalobacteraceae* y a los géneros *Pseudomonas*, *Stentrophomonas* y *Xanthomonas*, se correlacionaron directamente con los sustratos supresivos. Estos resultados sugieren que estos T-RFs podrían ser utilizados como indicadores del fenómeno de supresividad de un sustrato frente al damping-off causado por *R. solani*.

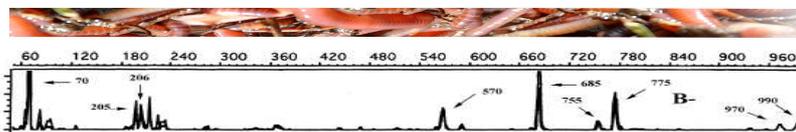
Por lo tanto, de acuerdo a los resultados de esta Tesis se concluye que las propiedades de promoción de crecimiento vegetal y el fenómeno de supresión a patógenos asociados al uso de los vermicompost se deben, entre otros factores, a la presencia de microorganismos benéficos presentes en la comunidad microbiana de éstos.

Esta conclusión se deberá confirmar con otros análisis que permitan corroborar el efecto benéfico de estos microorganismos y determinar si

esta conclusión es válida para todos los materiales compostados que presentan efectos de supresión de fitopatógenos.

Se espera además seguir profundizando en el análisis de las comunidades microbianas de materiales compostados con el fin de entender como optimizar las condiciones de producción de los vermicomposts o compost para lograr productos de mayor eficacia en la producción vegetal.

Perspectivas



Enmiendas orgánicas e impacto sobre la comunidad microbiana y la calidad del suelo

Los resultados de esta Tesis son una primera aproximación a un tema muy complejo que es la composición de las comunidades microbianas de enmiendas orgánicas y su correlación con los efectos positivos en la productividad de plantas. Es necesario por lo tanto realizar más estudios que permitan comprender a fondo estos efectos.

Con respecto al efecto de las enmiendas orgánicas aplicadas al suelo, se debería seguir profundizando en el estudio sobre las comunidades microbianas y su efecto sobre los rendimientos de los cultivos. Para ello se debería estudiar el efecto sobre otros microorganismos como los hongos, especialmente los hongos micorrízicos y sobre los microorganismos implicados en la fijación biológica del nitrógeno.

Dado que en el presente trabajo se observó un aumento de los T-RFs esperados para *Pseudomonas* y *Pantoea*, se debería aislar estos microorganismos a partir de las enmiendas o del suelo para estudiar sus características de promoción de crecimiento vegetal mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Una vez aislados estos microorganismos se podría estudiar su gen ARNr 16S y sus genes funcionales de interés, para diseñar primers o sondas específicas que permitan desarrollar metodologías (ej: PCR Tiempo Real) que sirvan para su cuantificación y seguimiento, ya sea durante el proceso de elaboración de las enmiendas o luego de aplicarse éstas en el suelo.

Dado que la madurez de la enmienda es un determinante sobre la productividad vegetal, y el método de hidrólisis de FDA mostró ser útil para estudiar esto, se debería llegar a correlaciones cuantitativas entre la tasa de hidrólisis de FDA y el contenido en porcentaje de carbono orgánico (y la relación C/N) y la biomasa microbiana presentes en las enmiendas, con el fin de determinar parámetros útiles que permitan monitorear la evolución de la madurez durante la fase de curado.

Debido a que los resultados de esta tesis sugieren que las enmiendas podrían revertir el efecto negativo de la aplicación de agroquímicos, este

campo de estudio puede tener una gran importancia a futuro. En otros grupos de investigación se está trabajando en esta área, como en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS, Murcia, España), en el cual se está investigando la aplicación de metodologías innovadoras como la proteómica del suelo, para buscar indicadores de contaminación orgánica e inorgánica e indicadores asociados a la remediación por aplicación de enmiendas.

Sustrato en base a materiales compostados y supresión de fitopatógenos

Según los resultados de esta Tesis, ciertos T-RFs mostraron estar correlacionados a la supresividad a *R. solani*, sería entonces importante determinar una correlación cuantitativa entre la abundancia relativa de éstos T-RFs y el grado de supresividad de un sustrato. El estudio debería también extenderse a las comunidades de los hongos dado la implicancia de especies fúngicas en el biocontrol.

Por otra parte sería importante verificar el efecto supresivo de los microorganismos que se postulan como biocontroladores. Para ello se debería aislar los microorganismos implicados en el biocontrol (bacterias y hongos) y estudiar los mecanismos de acción de estos sobre los patógenos. Para el caso de las bacterias una vez aisladas, se podría analizar sus secuencias ARNr 16S y comparar el tamaño de T-RF correspondiente y los perfiles T-RFLP observados. Esto también permitiría diseñar primers o sondas que permitan el desarrollo de metodologías moleculares de cuantificación como el PCR Tiempo Real. Estas metodologías podrían ser útiles para el monitoreo durante el proceso de elaboración de los materiales compostados y determinar cuales son las mejores condiciones operativas durante dicho proceso. Además podría permitir el monitoreo en el tiempo luego de la elaboración del sustrato para conocer el lapso de tiempo en que podría caducar la propiedad supresiva.

El aislamiento de los microorganismos biocontroladores podrá facilitar la inoculación y la bioaumentación de éstos en los materiales compostados con el fin de aumentar su calidad.