

2.3. INDICADORES BIOLÓGICOS PARA EVALUAR LOS AGROECOSISTEMAS

2.3.4. COMUNIDADES MICROBIANAS - ÍNDICE DE PATOGENICIDAD DEL SUELO - Ejemplo para secuencias con leguminosas forrajeras

Nora Altier y Stella Zerbino

Introducción

Las comunidades microbianas del suelo juegan un rol fundamental en los procesos que ocurren en el suelo, entre otros en la expresión o supresión de enfermedades que afectan a los cultivos. Particularmente, la densidad y diversidad microbiana y la disponibilidad de nutrientes son factores determinantes del potencial de un suelo para inducir o suprimir la ocurrencia de enfermedad, y son afectados por diversas prácticas agronómicas como la secuencia de cultivos, el tipo de laboreo y el manejo de suelo (Kinkel et al., 2011; van Elsas et al., 2002).

Los microorganismos patógenos del suelo tienen mecanismos alternativos y eficientes de sobrevivencia y presentan una alta capacidad de competencia saprofitica, lo que dificulta su control. Por esta razón, las estrategias de manejo deben apuntar a la prevención de las enfermedades y a la minimización de las pérdidas que ellas ocasionan. El desarrollo de indicadores del potencial patogénico de un suelo puede realizar una contribución adicional para el manejo de sistemas de producción sustentables (Skipp et al., 1997).

Los objetivos de este trabajo fueron: 1. determinar si la densidad poblacional de microorganismos patógenos y antagonistas y el índice de patogenicidad del suelo (IPS) son adecuados para caracterizar y diferenciar distintas intensidades de uso del suelo, en un sistema de rotaciones de cultivos y pasturas bajo siembra directa y con pastoreo; 2. definir el momento más adecuado de muestreo y la especie indicadora más sensible para estimar el IPS mediante bioensayos; 3. explorar las relaciones de las variables biológicas estimadas con algunas propiedades físico-químicas del suelo.

Materiales y Métodos

Descripción del sitio experimental

Desde 2004 hasta 2007, en primavera y otoño se tomaron muestras de suelo en el experimento de rotaciones de INIA Treinta y Tres, instalado en 1995 sobre suelos Argisol y Planosol (Unidad Alférez). En este experimento se evalúan diferentes rotaciones de pasturas con cultivos forrajeros, que conforman cuatro intensidades de uso del suelo en siembra directa, sometidas a pastoreo: Mejoramiento permanente de campo (MP): pastura permanente de trébol blanco, lotus y raigrás renovada cada 3 o 4 años; Rotación larga (RL): dos años de cultivos forrajeros (avena y raigrás en invierno y sorgo o moha en verano) y 4 años de pastura (trébol blanco, lotus, festuca y dactylis) sembrada junto con un verdeo; Rotación corta (RC): dos años de cultivos forrajeros (avena y raigrás en invierno y sorgo o moha en verano) y 2 años de pastura (trébol rojo y raigrás); Cultivo continuo (CC): dos cultivos forrajeros por año en forma continua iguales a RC y RL.

El experimento se caracteriza por tener todos los componentes de las diferentes intensidades de uso del suelo al mismo tiempo, sin repeticiones; RL está compuesta por seis parcelas; RC por cuatro parcelas y CC y MP por una parcela respectivamente, por lo

que el ensayo consta de 12 parcelas de 6 ha cada una, que al inicio del experimento fueron asignadas en forma aleatoria a las distintas unidades experimentales (Terra y García Préchac, 2001). Todos los tratamientos están sometidos a pastoreo con las siguientes cargas animales: MP a 1,4 UG/ha, RC y RL a 1,9 UG/ha y CC a 2,5 UG/ha.

Determinación de la densidad de poblaciones microbianas

El muestreo de suelo se realizó con calador a 10 cm de profundidad, extrayéndose 45 tomas al azar para constituir una muestra compuesta, en cada unidad experimental. Las muestras fueron aireadas naturalmente y tamizadas para su homogenización.

Para el recuento de bacterias viables pertenecientes a los grupos *Pseudomonas* fluorescentes y esporulados aerobios, y actinomicetes, se suspendieron 5 g de suelo de cada muestra en 45 ml de pirofosfato de sodio 0.1% estéril y se agitaron vigorosamente durante 30 minutos. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron por duplicado en placas con medios semiselectivos. Para *Pseudomonas*, se usó King's B (KB, King et al., 1954) suplementado con ampicilina 50 µg/ml, cloramfenicol 12,5 µg/ml y cicloheximida 100 µg/ml (Geels y Schippers, 1983); para actinomicetes, Starch Casein Agar (SCA) suplementado con cicloheximida 100 µg/ml (Leoni y Ghini, 2003); para esporulados aerobios, TSA 1/10, incubando previamente las diluciones de suelo a 85 °C durante 30 minutos (Stevenson y Segner, 1992). Para la determinación de la densidad poblacional de *Fusarium oxysporum*, se utilizó el método de dilución en placa (1:150) sobre medio selectivo (Komada, 1975). El diseño experimental fue de BCA (bloques completos al azar) con 4 repeticiones. Todas las placas se incubaron en estufa a 25 °C y se determinó el número de colonias a las 48 h (*Pseudomonas* y esporulados) o a los 7 días (actinomicetes y *F. oxysporum*). Se determinó el porcentaje de humedad de cada muestra, para expresar los resultados como número de propágulos o UFC/g de suelo seco.

Potencial patogénico del suelo para el componente leguminosa

Una vez procesadas, aireadas y tamizadas en malla de 0.7mm, las muestras de suelo fueron divididas en dos bolsas de 1 kg. Una bolsa de cada tratamiento fue sometida a radiación de microondas (1250 w, 5 min, máxima potencia). Se utilizó la metodología propuesta por Skipp et al. (1997) y ajustada por Altier (2003) para estimar un índice de patogenicidad del suelo (IPS) mediante bioensayo con trébol rojo y lotus. Con el suelo tratado con microonda y no tratado se condujeron bioensayos maceteros en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz y temperatura; la unidad experimental consistió en una maceta con 20 semillas de trébol rojo o de lotus. El diseño experimental fue de BCA con 4 repeticiones: 12 parcelas x 2 tratamientos de suelo x 2 especies de leguminosas. Las variables medidas fueron: número de plantas a los 60 días expresado como % implantación, y peso seco de parte aérea y raíz a los 60 días expresado como biomasa seca total en g. Se calculó el IPS con las siguientes fórmulas:

$IPS-NP = 1 - (N^{\circ} \text{ plantas suelo sin tratar} / N^{\circ} \text{ plantas suelo tratado con MW})$

$IPS-PS = 1 - (\text{Peso seco plantas suelo sin tratar} / \text{Peso seco plantas suelo tratado MW})$

Análisis de las propiedades químicas y físicas

En cada unidad experimental se analizó una muestra compuesta por 45 tomas de suelo. Las muestras se tomaron a la profundidad de 10 cm. Las determinaciones realizadas fueron: densidad aparente, textura, C orgánico, N total, pH en agua, Capacidad de Intercambio Catiónico (Ca, Mg, K, Na), Fósforo disponible (Bray I), conductividad, materia orgánica particulada (POM), bases totales y acidez titulable.

Análisis estadístico

El análisis de las variables de densidad microbiana e IPS se realizó mediante el procedimiento GLM del SAS (1999) y las medias de los tratamientos fueron separadas

usando MDS de Fisher protegida ($P < 0.05$). Para los datos del año 2007, las diferencias entre tratamientos fueron determinadas mediante contrastes, de acuerdo a Zerbino et al. (2008). Para ordenar los tratamientos evaluados, las variables fueron sujetas a Análisis de Componentes Principales (ACP). La ordenación de la matriz de variables ambientales y la de variables biológicas se relacionó mediante un análisis de Colnercia (Dolédec y Chessel, 1994).

Resultados

Densidad de las poblaciones microbianas

De los grupos bacterianos estudiados, los actinomicetos fueron los más sensibles al manejo de suelo; su densidad poblacional fue mayor en los sistemas con mayor proporción de pastura. La densidad poblacional de *F. oxysporum* también varió de acuerdo a la intensidad de uso del suelo, siendo mayor en aquellos sistemas con mayor proporción de leguminosas. Sin embargo, la mayor densidad poblacional no siempre se correspondió con mayor IPS. Por tanto, no surge como un indicador sensible al uso del suelo, en cuanto a caracterizar la patogenicidad para el componente leguminosa.

Índice de patogenicidad del suelo

Las variables número de plantas y biomasa seca total registraron una respuesta significativa al tratamiento de suelo con microondas. Esto indica que ambas variables, así como las derivadas IPS-NP e IPS-PS, son discriminantes y sensibles para caracterizar las intensidades de uso del suelo y medir diferencias entre ellas. El muestreo de otoño permitió registrar mayores respuestas en ambas especies, con respecto al muestreo de primavera. A su vez, el trébol rojo fue la especie más sensible; por esta razón, para la matriz de datos del análisis multivariado y para la del análisis de contrastes del año 2007, sólo se utilizaron los resultados de los bioensayos de trébol rojo. Los valores de IPS-NP e IPS-PS fueron significativamente diferentes para los contrastes RL-RC y RC-CC. Así mismo, estos indicadores diferenciaron la fase pastura de la RC de la fase pastura de la RL.

Ordenación de los sistemas

El ACP se realizó integrando la matriz de datos de densidad microbiana e IPS utilizando trébol rojo como especie indicadora, para cuatro momentos de muestreo (primavera 2004, otoño 2005, primavera 2005 y otoño 2006). La Figura 1 muestra la ordenación de las cuatro intensidades de uso del suelo en función de los cuatro momentos de muestreo y las variables evaluadas. Los histogramas en el cuadrante inferior representan los porcentajes de la variación total explicados por los dos primeros ejes. En función del eje 1, en ambos otoños las variables permiten una mejor caracterización de los sistemas (Figura 1).

En otoño, el primer eje ordenó los sistemas según las variables estudiadas (Figura 2). No obstante, en el experimento de INIA Treinta y Tres, los resultados demuestran que El eje 1 separa los usos del suelo según intensidad, desde los más intervenidos (CC, RC) a los menos (RL y MP), que incluyen mayor proporción del tiempo con pastura y menor frecuencia de uso de glifosato. El mejoramiento permanente (MP) sostiene poblaciones más altas de microorganismos benéficos (*Pseudomonas*, actinomicetos, esporulados aerobios). El sistema de cultivo continuo (CC) se asocia a valores de IPS más altos; este sistema recibe dos aplicaciones por año de glifosato. La población de *Fusarium* no muestra una relación estrecha con los usos del suelo, concluyéndose que por sí sola no es adecuada como variable indicadora.

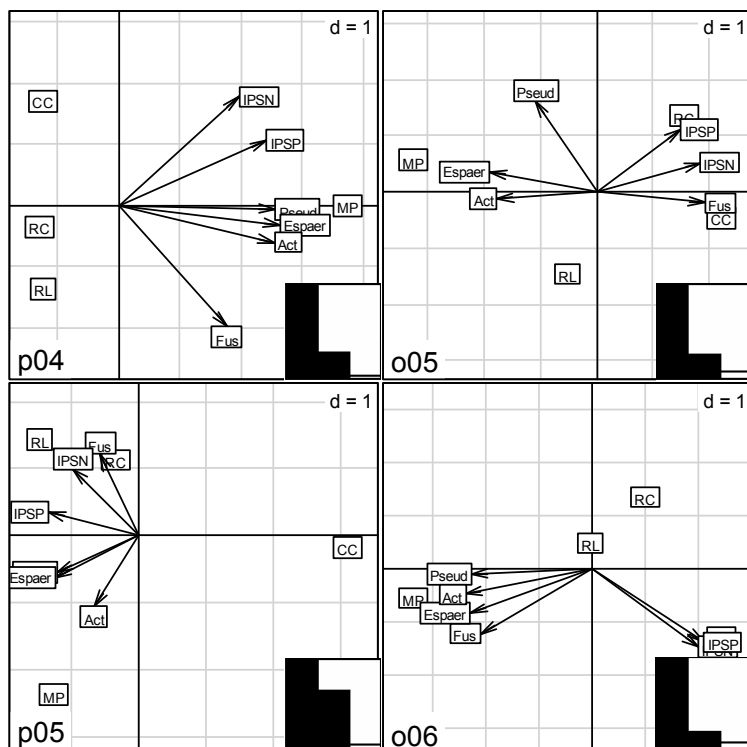


Figura 1. Análisis de Componentes Principales para las variables de densidad microbiana y potencial patógeno, en función de los usos del suelo en cuatro momentos de muestreo en el experimento de rotaciones de INIA Treinta y Tres.

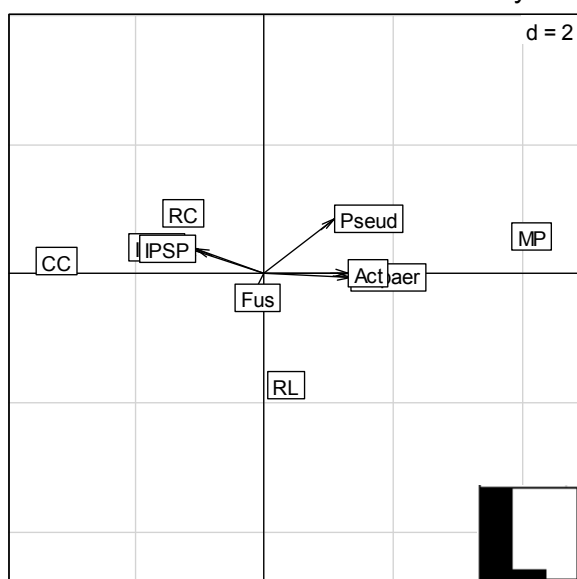


Figura 2. Resumen del Análisis de Componentes Principales para las variables de densidad microbiana y potencial patógeno, en función de los usos del suelo del experimento de rotaciones de INIA Treinta y Tres (valores promedio de otoño).

Relaciones entre variables biológicas y hábitat

Para la matriz de datos de 2006, el análisis de Colnercia fue significativo, mientras que para el 2005 no lo fue, si bien se mantuvieron las tendencias observadas. Para ambos años, los ejes principales explicaron el 73 y 82% de la variación, respectivamente. Respecto al eje principal, los tratamientos quedaron ordenados de acuerdo a la intensidad de uso del suelo.

En 2005, las densidades poblacionales de microorganismos antagónicos (*Pseudomonas*, actinomicetes y esporulados aerobios) se separaron de la densidad poblacional del *Fusarium oxysporum*. Las primeras se asociaron a ambientes con mayor contenido de Carbono orgánico, N, limo y Calcio; *F. oxysporum* se asoció a ambientes con arcilla. Las variables IPS-NP e IPS-PS se asociaron a ambientes con arena y alta densidad aparente, para el sistema con mayor intensidad de uso del suelo (CC). Cabe hacer notar que las poblaciones microbianas se asociaron a los sistemas con menor frecuencia de uso de glifosato.

En 2006, las variables IPS-NP e IPS-PS también se asociaron a ambientes con mayor densidad aparente y al sistema CC, mientras que las variables de densidad microbiana se asociaron a ambientes con mayor contenido de C orgánico y N que caracterizan a los sistemas de RL y MP.

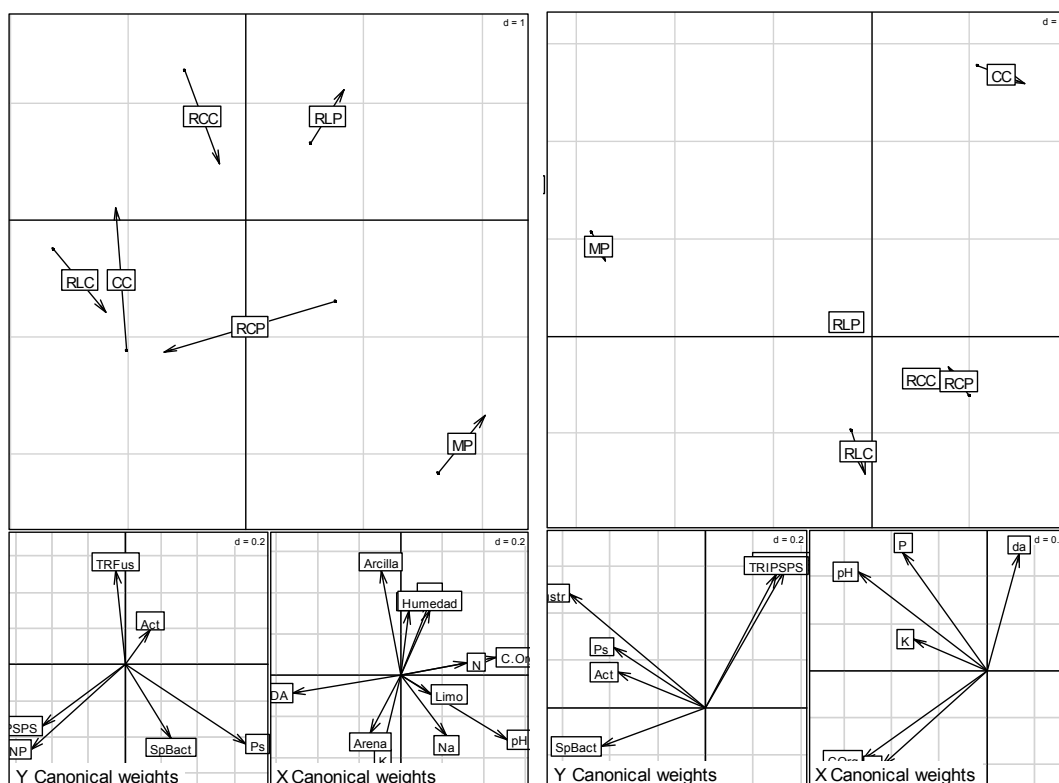


Figura 3. Análisis de coinercia para las variables de densidad microbiana y potencial patogénico, y propiedades físico-químicas del suelo, en el experimento de rotaciones de Treinta y Tres; muestreo de otoño 2005 (izquierda) y muestreo de otoño 2006 (derecha).

Discusión y Conclusiones

La intensidad de uso del suelo fue determinante de los resultados. El sistema de CC estuvo asociado a valores altos de IPS, mientras que los sistemas con pasturas (RL y MP) estuvieron asociados con valores altos de densidad poblacional microbiana. De los grupos bacterianos, los actinomicetes fueron los más sensibles a la intensidad de uso del suelo. La densidad poblacional de *F. oxysporum* no estuvo directamente asociada al potencial patogénico del suelo.

Las variables estudiadas permitieron expresar mayores diferencias cuando las muestras de suelo fueron colectadas en otoño. De las especies utilizadas en los bioensayos para determinar el índice de patogenicidad del suelo para el componente leguminosa, el trébol rojo fue más sensible que el lotus. Se puede concluir que el IPS es un buen indicador del potencial patogénico de diferentes ambientes y expresa una fuerte asociación con el nivel de perturbación en el sistema de producción.

El análisis de Colnercia demostró ser una herramienta útil para visualizar las relaciones entre las variables biológicas estudiadas y el hábitat, permitiendo evaluar el efecto de las distintas intensidades en el uso del suelo. Aquellos ambientes con Carbono orgánico y N que caracterizan a los sistemas con menor intensidad de uso del suelo (MP y RL), presentan valores altos de densidad microbiana y valores bajos de IPS. Los ambientes con bajo Carbono orgánico y alta densidad aparente que caracterizan al sistema con mayor intervención (CC), presentan altos valores de IPS. Debido a su sensibilidad a las prácticas agronómicas, algunas variables biológicas podrían ser consideradas como una herramienta adecuada para evaluar la sustentabilidad de diversas propuestas tecnológicas para el manejo de suelos y cultivos.

Bibliografía

- Altier, N. 2003. Caracterización de la población de *Fusarium oxysporum* y potencial patogénico del suelo bajo rotaciones agrícola ganaderas. Montevideo, INIA. Serie Técnica No.134:37-44.
- Dolédec, S., Chessel, D. 1994. Co-Inertia analysis: an alternative method for studying species-environment relationships. *Freshwater Biology* 31:277-294.
- Geels, F.P., Schippers, B. 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathologische Zeitschrift* 108:193-206.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44:301-307.
- Kinkel, L.L., Bakker, M.G., Schlatter, D.C. 2011. A coevolutionary framework for managing disease-suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology* 49:47-67.
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review Plant Protection Research* 8:114-125.
- Leoni, C., Ghini, R. 2003. Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade in vitro a *Phytophthora nicotianae*. *Fitopatologia Brasileira* 28:67-75.
- Skipp, R.A., Watson, R.N., Latch, G.C.M. 1997. Indicators of pathogen potential of pasture soils. In: *Proceedings of the XVIII International Grassland Congress*. Winnipeg, Manitoba; Saskatoon, Saskatchewan; Canada. ID No.1146. p.13-14.
- Stevenson, K.E., Segner, W.P. 1992. Mesophilic aerobic spore formers. In: C. Vanderzant, D.F. Splittstoesser (eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd Edition. American Public Health Association. p.265-274.

- Terra, J.A., García Préchac, F. 2001. Siembra directa y rotaciones forrajeras en las lomadas del este: Síntesis 1995 – 2000. Montevideo, INIA. Serie Técnica No.125. 100p.
- van Elsas, J.D., Garbeva, P., Salles, J. 2002. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation* 13:29-40.
- Zerbino, S., Altier, N., Morón, A., Rodríguez, C. 2008. Evaluación de la macrofauna del suelo en sistemas de producción en siembra directa y con pastoreo. *Agrociencia* Vol XII:44-55.

Palabras claves: densidad microbiana, índice de patogenicidad del suelo, indicadores biológicos, sistemas de producción