

Comunidad microbológica de suelos cultivados con cebolla

Plan de trabajo: beca de perfeccionamiento

AUTORES

Laura Navarro
Ariel Gajardo
Lucrecia Avilés

Proyecto de Investigación 04/V105
Caracterización de la horticultura en el Valle Inferior del río Negro en base a indicadores de sustentabilidad ambiental

INTEGRANTES DEL EQUIPO

DIRECTORA

Lucrecia María Avilés

CODIRECTOR

Omar Ariel Gajardo

ASESOR

Armando Anibal Dall Armellina

DOCENTES

Silvia Liliana Cañón

Norma Mercedes Cifone

Silvina Iribarne

Ángel Franco Mamani

Mónica Añazgo

Laura Inés Navarro (Becaria UNCo Perfeccionamiento)

EXTERNO

Carlos Rubén Bezic

RESUMEN

El sistema actual de cultivo de cebolla es altamente dependiente de insumos de síntesis química, especialmente debido a la escasa capacidad competitiva que presenta la planta. Así, en este cultivo se utilizan diferentes agroquímicos para reducir: la bacteriosis sobre las semillas, los insectos en el establecimiento del cultivo y las malezas por la competencia en los recursos. Además, suelen realizarse varias aplicaciones de fertilizantes. El manejo general de este cultivo, que permanece en el campo por más de nueve meses, ocasiona un alto impacto ambiental, persistiendo los excesos de agroquímicos aplicados al sistema suelo, agua y aire por tiempos que no están evaluados. Estos productos de síntesis podrían afectar la actividad y composición de las comunidades biológicas en el ambiente. Es por ello, que en el presente plan de trabajo de beca de perfeccionamiento se propone evaluar la incidencia de las sucesivas aplicaciones de agroquímicos en la producción de cebolla, sobre la flora microbológica del suelo. Los estudios de impacto se realizarán en dos niveles: i) efecto sobre las actividades microbianas como la respuesta de las enzimas presentes en el suelo y ii) efecto sobre la composición de las comunidades de microorganismos mediante aislamientos específicos a partir de diluciones suelo: medio líquido. Las comunidades microbológicas del suelo tienden a reaccionar de manera rápida y sensible a los cambios producidos por el manejo de los cultivos, por lo tanto, podrían constituir una señal temprana, y ser de utilidad para estimar el impacto ambiental que ellas ocasionan.

Palabras clave: Agroquímicos; Enzimas; Indicadores biológicos; Cultivo bajo riego; Impacto ambiental.

Marco teórico

El Valle Inferior de Río Negro (VIRN) es la segunda región productora de cebolla en importancia a nivel nacional. Es la hortaliza que más superficie ocupa en la región, llegando a implantarse en 2011 unas 2000 hectáreas, cerca del 69% de la superficie destinada a hortalizas. Respecto a lo sucedido en el 2005 (444 ha), su crecimiento en este valle fue del 331% (Tagliani *et al.*, 2011). Ya en 1995, van Konijnenburg y Martínez visualizaban al cultivo de cebolla como el de mayores posibilidades de expansión en el VIRN, así como en otros valles irrigados de la Norpatagonia.

El sistema actual de cultivo de cebolla es altamente dependiente del uso de agroquímicos, especialmente debido a la escasa capacidad competitiva que presenta la planta de cebolla (Bezic *et al.* 2009). Así, en este cultivo se utilizan diferentes productos para el control de malezas, los que pueden clasificarse de acuerdo con el momento de aplicación en preemergentes (PRE) y post emergentes (POS). Los herbicidas PRE deben aplicarse sobre suelo desnudo antes de la emergencia de las malezas pues actúan en general con base en una cierta persistencia en el suelo que posibilita interferir procesos biológicos clave como la germinación y emergencia de malezas sin afectar al cultivo. Los herbicidas POS, por su parte, requieren ser aplicados sobre la superficie vegetal actuando por contacto o de manera sistémica, pero siempre en base a la absorción efectiva por la superficie foliar (García Torres *et al.*, 1991, Kogan 1992). Otra problemática de esta especie es su susceptibilidad a enfermedades de origen bacteriano por lo que las semillas deben recibir el tratamiento bactericida previo a la siembra (Macías Duarte *et al.*, 2016). También es sensible a plagas como trips que obligan a realizar reiteradas aplicaciones de insecticidas (Aguilar Carpio *et al.*, 2017).

El manejo general de este cultivo, que permanece en el campo por más de nueve meses, ocasiona un alto impacto ambiental, persistiendo los excesos de agroquímicos aplicados al sistema suelo, agua y aire por tiempos que no están evaluados. Estos productos de síntesis podrían afectar la actividad y composición de las comunidades biológicas en el ambiente.

Los microorganismos del suelo juegan un rol fundamental en el mantenimiento y dinámica de los nutrientes a través del ciclado de la materia orgánica. Las bacterias u hongos sintetizan o secretan enzimas extracelularmente que forman parte de la matriz del suelo (Aon & Colaneri, 2001; Tripathi *et al.*, 2007). Las actividades de estas enzimas exocelulares, pueden estar reguladas de manera indirecta a través de un aumento de la producción y secreción de microorganismos, o directamente a través de condiciones físicoquímicas ya que pueden ser estabilizadas por medio de la unión de las enzimas a los coloides del suelo (Sinsabaugh, 1994).

Así, por ejemplo, la ureasa es una exoenzima que cataliza la reacción de hidrólisis de la urea, el principal producto celular nitrogenado de la degradación de las proteínas y los ácidos nucleicos, el cuál es más fácil de eliminar que otras formas de nitrógeno (como el amoníaco) porque es soluble en agua y menos tóxica (Science in school, 2008). La ureasa se encuentra principalmente en semillas, microorganismos e invertebrados. Su pH óptimo es 7,4 y su temperatura óptima 60 °C (Kandeler y Gerber, 1988). Muchos animales excretan urea en la orina. Los microorganismos del suelo se alimentan de la orina animal produciendo ureasa para transformar la urea en amonio que es entonces fácilmente accesible para las plantas. Por ello la ureasa es abundante en el suelo (García *et al.*, 2003). Además, como la urea es aplicada como fertilizante, es común encontrar esta enzima en suelos agrícolas.

Otras enzimas presentes en el suelo son las deshidrogenasas que pertenecen al grupo de las oxidoreductasas. Las deshidrogenasas están presentes en todos los seres vivos, en particular levaduras y bacterias. Son claves en el metabolismo energético de las células, ya que participan en la glucólisis, la fermentación y el ciclo de Krebs (Ríos Velázquez *et al.*, 2008). La actividad de la deshidrogenasa ha sido utilizada como un indicador de la actividad microbiana del suelo.

Un grupo de diferentes enzimas extracelulares como: proteasas, lipasas y esterasas; o unidas a membrana, suelen utilizarse como indicadores de la contaminación por pesticidas de los suelos. La técnica utilizada para su cuantificación se basa en la hidrólisis del diacetato de fluoresceína, el producto de la reacción

enzimática es la fluoresceína, la cual puede ser medida por espectrofotometría (Ramírez-Fuentes y Trujillo-Tapia, 2012).

Por ende, las actividades enzimáticas permiten monitorear el funcionamiento del suelo, respondiendo a la necesidad de entender los efectos positivos y negativos sobre las propiedades y los procesos que suceden dentro de esta matriz y las relaciones entre estos factores, los usos y prácticas de manejo (Madsen, 2008; Rivas *et al.*, 2009).

Las prácticas de manejo agrícola pueden tener grandes impactos en el tamaño, la actividad, la composición y diversidad de las comunidades microbianas del suelo (Ge *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2012). Debido a que los microorganismos afectan la mayoría de las transformaciones de nutrientes, la presencia de comunidades microbianas diversas en el suelo es esencial para la sustentabilidad de los agroecosistemas (Romaniuk *et al.*, 2011). Dado que los microorganismos contribuyen a la nutrición y salud de las plantas, sus propiedades son de gran importancia para determinar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. Los microorganismos son cada vez más utilizados para evaluar la influencia de las prácticas agrícolas en la calidad y fertilidad del suelo. Ello se debe a su rápida respuesta, alta sensibilidad, importancia ecológica y capacidad de presentar información que integra muchos factores ambientales (Azeez *et al.*, 2010; Epelde *et al.*, 2014). A través de la biodiversidad microbiana y gracias a la presencia de diferentes grupos funcionales y de las interacciones entre ellos, el suelo proporciona servicios ecosistémicos clave para el desarrollo de los cultivos. Esta red de interacciones biológicas que tiene lugar en la matriz del suelo genera coalescencia entre comunidades microbianas y es determinante para la fertilidad edáfica (Rillig *et al.*, 2016). Las modificaciones ambientales producidas por diferentes prácticas agrícolas alteran las interacciones entre las comunidades microbianas (inhibiendo o promoviendo diferentes procesos), afectando inevitablemente las funciones biológicas resultantes (Rillig *et al.*, 2015).

Por todo esto, en este plan de trabajo de la beca de perfeccionamiento de la Universidad Nacional del Comahue, se propone conocer la comunidad microbiológica de los suelos del VIRN, para diagnosticar el impacto ambiental que ocasiona el excesivo uso de agroquímicos empleados en el cultivo de cebolla.

Hipótesis

La alta dependencia de agroquímicos en el cultivo de cebolla modifica la composición y actividad de la comunidad microbiológica del suelo.

Objetivo general

Evaluar la incidencia de las sucesivas aplicaciones de agroquímicos en la producción de cebolla, sobre la flora microbiana del suelo.

Objetivos específicos

- Conocer la composición de la comunidad microbiana del suelo donde se ha cultivado cebolla.
- Analizar el efecto de un fungicida de presembrado sobre la composición y actividad de la comunidad microbiana del suelo.
- Analizar el efecto de varias aplicaciones de herbicidas sobre la composición y actividad microbiana del suelo.

Metodología

Los estudios de impacto sobre las comunidades microbianas del suelo se realizarán en dos niveles:

1. efecto sobre las actividades microbianas como la respuesta a la aplicación de agroquímicos de las enzimas presentes en el suelo: actividad deshidrogenasa por hidrólisis de TTC (Casida *et al*, 1964), actividad esterasas por hidrólisis de FDA (Alef, 1995) y actividad ureasa por hidrólisis de la urea (Tabatabai y Bremner, 1972).
2. efecto sobre la composición de las comunidades de microorganismos como respuesta a la aplicación de agroquímicos en el cultivo de cebolla: respiración del suelo por reacción con NaOH y aislamientos específicos a partir de diluciones suelo:medio líquido (10^{-1} a 10^{-10}) sembradas en placas con sustratos específicos (Félix *et al*, 1996). Luego pruebas bioquímicas para confirmar las colonias caracterizadas.

Experimento I: composición de la comunidad microbiana de suelos poscultivo de cebolla

Se tomarán muestras compuestas de los primeros 10 cm de suelos donde se ha cultivado cebolla por diferentes ciclos de producción:

T1: Suelo sin cultivar

T2: Suelo cultivado con cebolla por un año

T3: Suelo cultivado con cebolla por tres años

Experimento II: efecto del fungicida sobre la composición y actividad microbiana del suelo

Se acondicionarán suelos del VIRN en macetas a los que se les incorporarán los fungicidas empleados en semilla para control de patógenos en presiembra.

T1: dosis baja

T2: dosis normal

T3: dosis alta

T4: Testigo

Experimento III: efecto de aplicaciones sucesivas de herbicidas sobre la composición y actividad microbiana del suelo

Se acondicionarán suelos del VIRN en macetas a los que se les aplicaran distintas combinaciones de herbicidas PRE y POS emergentes

T1: herbicida PRE, dosis normal y herbicida POS dosis normal

T2: herbicida PRE, dosis normal y herbicida POS dosis alta

T3: herbicida PRE, dosis alta y herbicida POS dosis normal

T4: herbicida PRE, dosis alta y herbicida POS dosis alta

Lecturas sugeridas

1. Aguilar Carpio, C.; González Rendón, A.; Pérez Ramírez, A.; Ramírez Rojas, S. Y Carapia Ruiz, V. 2017. Combate químico de *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) en el cultivo de cebolla, en Morelos, México. *Acta Zoologica Mejicana*. 33(1): 39-44.
2. Alef, K. 1995. Estimation of the hydrolysis of fluorescein diacetate. (p.: 232-233). In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Ed. Alef, K.; Nannipieri, P. Academic Press Inc., San Diego. 575 p.
3. Aon, M.A. y A.C. Colaneri. 2001. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *App. Soil Ecol.* 18: 255-270.
4. Azeez, J. y Averbeke, W. 2010. Nitrogen mineralization potential of three animal manures applied on a sandy clay loam soil. *Bioresources Technology* 101:5645-5651.
5. Bezic, C.R.; A. Dall Armellina; O.A. Gajardo; L. Avilés and S. Cañón. 2009. Growth interference of invasive Russian knapweed on “Valcatorce INTA” onion. *Journal of Applied Horticulture*, 11(1): 68-72.
6. Casida, L.E., Klein, D.A., Santoro, T. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*. 98, 371-376.
7. Epelde, L.; Mijangos, I. y Garbisu, C. 2014. Microbial properties and attributes of ecological relevance for soil quality monitoring during a chemical stabilization field study. *Applied Soil Ecology* 75:1-12.
8. García Torres, L., C. Fernandez-Quintanilla. 1991. *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. Ministerio de Agricultura. Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario.
9. García, C.; Gil, F.; Hernandez, T. y Trasar, C. 2003. *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Ed. Mundi-Prensa. España.

10. Ge, T.; Nie, S.; Wu, J.; Xiao, H.; Hong, Y.; Wang, S.; Kozo, I. y Huang, D. 2011. Chemical properties, microbial biomass, and activity differ between soils of organic and conventional horticultural systems under greenhouse and open field management. *Journal Soil Sediments* 11:25-36.
11. Kandeler, E. y Gerber, H. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and fertility of soils* 6:68-72.
12. Kogan, M. 1992. *Ecofisiología y efectividad de control*. Ed. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía. 402 pág
13. Macías Duarte, R.; Grijalva Contreras, R.; Núñez Ramírez, F.; Robles Contreras, F. y López Carvajal, A. (2016) Eficiencia de diferentes fungicidas en el control de la pudrición rosada en cebolla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(8):1933-1943.
14. Madsen, E. 2008. *Environmental Microbiology from genome to biogeochemistry*. Blackwell Publishing, 479 pág.
15. Ramírez-Fuentes, E. y Trujillo-Tapia, Ma.N. 2012. La hidrólisis de diacetato de fluoresceína [3',6'-diacetilfluoresceína]: un método rápido y eficaz para determinar la actividad microbiana en muestras de suelo contaminado por pesticidas. *Ciencia y Mar* XVI (47): 31-36.
16. Rillig, M.; Antonovics, J.; Caruso, T.; Lehmann, A.; Powell, J.; Veresoglou, S. y Verbruggen, E. 2015. Interchange of entire communities: microbial community coalescence. *Trends Ecology Evolution* 30(8):470-476.
17. Rillig, M. y Lehmann, A. 2016. Soil microbes and community coalescence. *Pedobiologia* 59(1-2):37-40.
18. Ríos Velázquez, C.; Curvalo, D.; Alto, L.; González, L.; Negrón, C.; Pérez, C.; Santiago, J.; Torres, L. y Velázquez, A. 2008. *Deshidrogenasas*. Departamento de biología. Universidad d Puerto Rico, Recinto universitario de Magagüez, Puerto Rico.
19. Rivas, Y., Oyarzún, C., Godoy, R. y Valenzuela, E. 2009. Mineralización del Nitrógeno, Carbono y actividad enzimática del suelo en un bosque de *Nothofagus*

- obliqua (Mirb) Oerst y una plantación de *Pinus radiata* D. Don. del Centro-Sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural.*, 82: 119-134.
20. Romaniuk, R.; Giuffre, L.; Costantini, A. y Nannipieri, P. 2011. Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems. *Ecological Indicator* 11:1345 -1353.
21. Science in school. 2008. <http://www.scienceinschool.org/print/1074>
22. Sinsabaugh, R.L. 1994. Enzymatic analysis of microbial pattern and process. *Biol. Fertil. Soils* 17: 69-74.
23. Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. 1972. Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry.* 4, 479-487.
24. Tagliani, P.R.; D.J. Miñon; Y. Di Nardo; F.A. La Rosa; O.J. Lascano; Telleria, M. A. C. y Villegas Nigra, H. M. 2011. Valor agregado de la actividad económica primaria del Valle Inferior del río Negro. *Río Negro.* 160 pág.
25. Tian, J.; Fan, M.; Guo, J.; Marschner, P.; Li, X. y Kuzyakov, Y. 2012. Effects of land use intensity on dissolved organic carbon properties and microbial community structure. *European Journal of Soil Biology* 52:67-72.
26. Tripathi, S; A Chakraborty; A Chakrabarti & BK Bandyopadhyay. 2007. Enzyme activities and microbial biomass in coastal soils of India. *Soil Biol. Biochem.* 39: 2840-2848.
27. van Konijnenburg, A. y Martínez, R. M. 1995. Cebolla en el norte de la Patagonia. Técnicas disponibles para una producción exitosa. Información técnica N° 4. EEA Valle Inferior del Río Negro. Convenio IDEVI-INTA. 49 pág.