



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIONGENIERÍA

**“Comunidades bacterianas de lixiviados de
vermicomposta y de un suelo salino alcalino”**

T E S I S

Que presenta

Elda Mireya Romero Tepal

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directores de la Tesis:

Dr. Luc Julien Jerome Dendooven

Dr. Rodolfo Marsch Moreno

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el laboratorio de ecología de suelos del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, bajo la dirección del Dr. Luc Julien Jerome Dendooven y el Dr. Rodolfo Marsch Moreno.

Para la realización del presente trabajo, fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con una beca de Doctorado (304991) para Elda Mireya Romero Tepal.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al término de la presente Tesis Doctoral, quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han colaborado en la elaboración de este trabajo, así como aquellas personas que con su apoyo moral me han ayudado durante los años que he dedicado al desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A las instituciones que han permitido la realización de esta Tesis: al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, departamento de Biotecnología y Bioingeniería, lugar donde se ha realizado la mayor parte de esta tesis.

A mis Directores de Tesis, el Dr. Luc Julien Jerome Dendooven y el Dr. Rodolfo Marsch Moreno, por confiar en mi para el desarrollo de este trabajo experimental así como la magnífica labor que han realizado a la hora de dirigir la investigación durante cuatro años; periodo durante la cual me han prestado una ayuda personal y comprensión de un valor incluso mayor al de su sobresaliente labor profesional.

A la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara, al Dr. Frédéric Thalasso, al Dr. Fernando José Esparza García, al Dr. Hugo César Ramírez Saad, al Dr. César Hugo Hernández Rodríguez, por su dedicación y ayuda durante el periodo de investigación tutelada del programa de Doctorado en Biotecnología y Bioingeniería.

A Yendi por todo el trabajo que ha realizado en la parte experimental de esta tesis, siempre de forma voluntariosa y con una sonrisa, enseñándome muchísimo en el campo de la biología molecular. Sin ella esta tesis no hubiese sido posible.

A Selene por todo su apoyo y cariño, no hubiese sido lo mismo sin ese montón de risas que nos hemos pegado en el laboratorio.

A todos los demás compañeros Rosario, Nadia, Josef, Arit, Yohana, Norma, Cesar, Javier, Janeth, Marisol, que han sido unos verdaderos compañeros, siempre dispuestos a ayudar en todo lo que podían, y lo que es aun más importante, unas personas con las que te dan ganas de trabajar cada día.

A las personas restantes de este grupo de investigación, Dr. Marco y Blanquita que me trataron muy bien desde el primer momento de mi llegada al grupo hasta ahora, con los que he pasado momentos inolvidables.

A mis amigos Emmanuel, Mauri y mis amigas Yunhue, Yendi, Selene, Nadia, fuera del mundo del laboratorio que me han ayudado a desconectar del absorbente mundo de la ciencia, aunque fueran culpables de que más de un día llegara al laboratorio sin dormir o con resaca.

A todos los miembros de mi familia: mi padre, mi madre, mis hermanos Paco y Beto, mi abuelita Gabis, por estar siempre pendientes de mi desde Puebla, ofreciéndome su cariño, apoyo, ayuda y comprensión, lo cual ha hecho posible el desarrollo de esta tesis. En particular, a mi hija Itzayana, que aunque no sabe muy bien porque me ausento tantos días de casa, ella me motivó para seguir adelante.

¡Gracias!.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	1
SUMMARY	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Importancia de la diversidad bacteriana	3
1.2. Microorganismos implicados en los lixiviados de vermicomposta	4
1.3. Comunidades bacterianas en suelos salinos alcalinos	7
1.4. Justificación	9
1.5. Hipótesis del trabajo	9
1.6. Objetivos generales del trabajo	10
CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LIXIVIADOS DE VERMICOMPOSTA	11
2.1. Antecedentes	11
2.2. Materiales y métodos	12
2.2.1. Esquema general de trabajo	12
2.2.2. Preparación de los lixiviados de vermicomposta	12
2.2.3. Caracterización de los lixiviados	12
2.2.4. Aislamiento del DNA metagenómico, amplificación del rDNA 16S y pirosecuenciación	13
2.2.5. Análisis estadístico y análisis de las secuencias	14
2.3. Resultados y discusión	15
2.3.1. Composición de las comunidades bacterianas en los lixiviados	15

2.3.2. Fitopatógenos en los lixiviados	18
2.3.3. Cambios en las comunidades bacterianas durante el almacenamiento de los lixiviados	21
2.4. Conclusiones del Capítulo	23
CAPÍTULO 3. EFECTO DEL RASTROJO Y DE LA FRACCIÓN (HEMI)CELULÓSICA DE MAÍZ EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE UN SUELO SALINO ALCALINO	24
3.1. Antecedentes	24
3.2. Materiales y métodos	25
3.2.1. Esquema general de trabajo	25
3.2.2. Descripción del sitio de estudio	25
3.2.3. Incubación aerobia, tratamientos con rastrojo y fracción de (hemi)celulósica de maíz	26
3.2.4. Aislamiento del DNA metagenómico, amplificación del rDNA 16S y pirosecuenciación	27
3.2.5. Análisis estadístico y análisis de las secuencias	29
3.3. Resultados y discusión	30
3.3.1. Efecto de la variación de la CE y el pH sobre las comunidades bacterianas en tres sitios diferentes del suelo salino alcalino	30
3.3.2. Mineralización del carbono y los cambios de la estructura de las comunidades bacterianas	34
3.4. Conclusiones del Capítulo	38
RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Tabla 1. Lixiviado obtenido de vermicomposta de estiércol de vaca almacenado por 0, 14 y 28 días.	15
Tabla 2. Resultados del análisis de pirosecuenciación e índices de diversidad alfa.	16
Figura 1. Distribución taxonómica a nivel de <i>phylum</i> .	17
Figura 2. Distribución taxonómica a nivel de orden.	18
Figura 3. Distribución taxonómica a nivel de género (los más abundantes i.e.>%).	20
Figura 4. Análisis “weighted UniFrac” de las comunidades bacterianas en lixiviados de vermicomposta en el día 0 (□), día 14 (n) y día 28 (○).	21
Tabla 3. Características de los tres sitios de estudio.	26
Figura 5. Abundancia relativa (%) de los <i>phyla</i> más importantes, las bacterias no determinadas y la suma de los que presentan una abundancia relativa de <1 % de tres suelos con diferentes conductividades electrolíticas del exlago de Texcoco.	30
Figura 6. Análisis de los componentes principales teniendo en cuenta la abundancia relativa (%) de los diferentes <i>phyla</i> bacterianos en los suelos nativos del exlago de Texcoco con CE de 1.9 dS m ⁻¹ (■), 17.2 dS m ⁻¹ (■) y 33.4 dS m ⁻¹ (■), día cero (D0), día uno (D1), día tres (D3), día siete (D7) y día catorce (D14).	31
Figura 7. Análisis de correlación canónica considerando los porcentajes de los diferentes <i>phyla</i> y las características de los suelos sin tratamiento con CE de 1.9 dS m ⁻¹ (■), de 17.2 dS m ⁻¹ (■) y 33.4 dS m ⁻¹ (■) en el día cero.	32
Figura 8. Emisión de CO ₂ en los tratamientos: con rastrojo y FDN de maíz en los diferentes tipos de los suelos del exlago de Texcoco.	34

Figura 9. Abundancia relativa (%) de los grupos bacterianos más importantes 36
en los tres suelos del exlago de Texcoco con diferentes
conductividades electrolíticas, sin tratamiento (control), con rastrojo
y FDN de maíz (tratamientos), en el día cero (0), día uno (1), día
tres (3), día siete (7) y día catorce (14).

Figura 10. Análisis de los componentes principales teniendo en cuenta los 37
porcentajes de los diferentes *phyla* en los suelos del exlago de
Texcoco, con CE de 1.9 dS m^{-1} , sin tratamiento (■), rastrojo de
maíz (▲), FDN de maíz (●); con CE de 17.2 dS m^{-1} , sin tratamiento
(■), rastrojo de maíz (▲), FDN de maíz (●), con CE de 33.4 dS m^{-1} ,
sin tratamiento (■), rastrojo de maíz (▲), FDN (●), día cero (D0),
día uno (D1), día tres (D3), día siete (D7) y día catorce (D14).

Abreviaturas

CE	Conductividad electrolítica
CCA	Análisis de correspondencia canónica
CRA	Parámetro de capacidad de retención de agua en el suelo
dS m⁻¹	deciSiemens por metro
FAO	Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDN	Fracción de (hemi)celulósica
MID	Identificadores multiplex
OTU	Unidades taxonómicas operacionales
PCA	Análisis de componentes principales
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR	Promotoras del crecimiento vegetal
pH	Potencial de hidrógeno
rDNA 16S	Ácido desoxirribonucleico ribosomal 16S
rRNA 16S	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal 16S
SIP	Prueba de isotopo estable

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron las comunidades bacterianas de distintos ecosistemas, como los lixiviados derivados de vermicomposta y de tres suelos salinos alcalinos con diferentes conductividades electrolíticas (CE) y pH. Se buscó relacionar la estructura de las comunidades bacterianas con las propiedades que presenta cada ambiente, por ejemplo, en el caso de los lixiviados se describen los microorganismos responsables de algún efecto benéfico o nocivo para los cultivos agrícolas de tres días de almacenamiento, en los diferentes suelos salinos alcalinos, se estudió el efecto de residuos orgánicos como el rastrojo y la fracción de (hemi)celulósica de maíz y su efecto sobre las comunidades bacterianas. Para ello, se construyeron librerías de amplicones del rDNA 16S usando iniciadores universales, que posteriormente fueron secuenciados en una plataforma de GS-FLX Titanium 454 pyrosequencer de Roche. Los resultados de estos estudios se muestran en los Capítulos 2 y 3.

En el Capítulo 2 se describe que en los lixiviados frescos (día 0) se identificó una abundante población de *Mollicutes*, particularmente del género *Acholeplasma*, que son microorganismos fitopatógenos. La abundancia de los *Mollicutes* disminuyó con el almacenamiento del lixiviado, mientras que los *Rhizobiales* y el género *Pseudomonas* aumentó.

Y en el Capítulo 3 se describe que con la aplicación de la materia orgánica, aumenta o disminuye la abundancia relativa de las comunidades bacterianas. El rastrojo de maíz favoreció la abundancia relativa de *Nocardiopsaceae* (género *Prauseria*) y con la fracción (hemi)celulósica aumentó la abundancia relativa de *Xanthomonadeae* y *Pseudomonadeae*. Sin embargo, se observó una disminución en la abundancia relativa de *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*, que pertenecen a poblaciones de ecosistemas oligotróficos.

SUMMARY

In this study the bacterial communities in different ecosystems, such as derivatives of vermicompost leachates and three saline-alkaline soils with different electrolytic conductivity (EC) and pH were studied. The relationship among the structure of bacterial communities with the properties of their individual environment was sought, for example, in the case of leachate the composition of bacterial communities was studied to describe the microorganisms that could be responsible for any beneficial or harmful effects on agricultural crops. Furthermore, the effect of organic wastes as stubble or the hemi(cellulosic) fraction of corn on bacterial communities in different alkaline saline soils were studied also. To this, libraries of 16S rDNA amplicons using universal primers were built and sequenced on a GS-FLX platform Pyrosequencer Roche Titanium 454. The results of these studies are shown in Chapters 2 and 3.

Chapter 2 describes how the bacterial communities of leachate changed during storage. In fresh leachate (day 0) *Mollicutes* were abundant, particularly the genus *Acholeplasma*, which includes phytopathogenic microorganisms. The abundance of *Mollicutes* decreased during storage, while *Rhizobiales* and the genus *Pseudomonas* increased.

And Chapter 3 describes that the application of organic matter, increases or decreases the relative abundance of bacterial communities. Corn stubble favored the relative abundance of *Nocardiopsaceae* (genus *Prauseria*) and with the hemi(cellulosic) fraction increased the relative abundance of *Xanthomonadeae* and *Pseudomonadeae*. However, a decrease was observed in the relative abundance of *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia*, belonging to oligotrophs.

1.1. Importancia de la diversidad bacteriana

Las bacterias constituyen el más abundante y diverso grupo de microorganismos en el planeta, son ubicuos, es decir, se encuentran en todos los hábitats tanto terrestres como acuáticos y desempeñan un papel dominante en las reacciones bioquímicas esenciales para el sostenimiento de la biósfera, donde son imprescindibles para el reciclaje de algunos elementos químicos como en el nitrógeno y el carbono, también muchos pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos dependen de estos microorganismos (Whitman et al. 1998; Fredrickson et al. 2004). Además, las bacterias son importantes en los procesos industriales como la degradación de una gran variedad de compuestos orgánicos (tratamiento de aguas residuales y biorremediación) (Cohen 2002; Neves et al. 2006), en la síntesis de sustancias químicas como alcohol etílico, ácido acético, alcohol butílico, acetona, productos farmacéuticos y agroquímicos (Liese et al. 1999; Aronson y Shai, 2001; Chattopadhyay et al. 2004) y para la preparación de alimentos fermentados (Hagedorn y Kaphammer 1994; Johnson y Lucey 2006).

Actualmente, se han encontrado hasta 100,000 especies únicas por gramo de suelo y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce, en total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo (Whitman et al. 1998; Charlop-Powers 2014).

Por lo tanto, las células bacterianas han desarrollado una amplia gama de estrategias metabólicas que les han permitido crecer en cualquier ambiente, pueden sobrevivir en hábitats extremos que incluyen variaciones en la temperatura, luz, pH, presión, salinidad y componentes de materia orgánica e inorgánica (resaltando el sulfuro de amonio, gas hidrógeno y metano), al igual que pueden soportar hábitats anóxicos (Madsen, 2005). Sin embargo, únicamente entre 0.1 y 10 % de las bacterias en el medio ambiente son cultivables (Rondon et al. 1999; Tiedje et al. 1999; Handelsman et al. 2002;

Torsvik et al. 2002; Rappé y Giovannoni 2003), con las técnicas y medios actuales, por lo que la gran parte de especies bacterianas existentes (cerca del 90 %), no han sido identificadas.

Por consiguiente, el estudio sobre el análisis de las comunidades bacterianas se ha enfocado en el uso de la secuencia de las regiones del DNA que codifican para el rRNA 16S (rDNA), que es un marcador filogenético conservado que puede ser amplificado por PCR usando iniciadores "universales", y actualmente, están disponibles más de tres millones de secuencias del rDNA 16S (<http://rdp.cme.msu.edu/>), algunas de estas secuencias son derivadas de especies cultivables, pero la mayoría se han obtenido de especies aún no cultivadas (Nelson 2013).

Sin embargo, todavía no se alcanza un registro completo de la diversidad microbiana en la mayoría de los entornos, pero se ha empezado a entender cómo está estructurada entre los hábitats, al igual que cómo es afectada por los factores ambientales o humanos y cómo puede influir en la estabilidad y el funcionamiento de los ecosistemas naturales (McCaig et al. 1999; Nübel et al. 1999; Hoshino et al. 2001; Zhou et al. 2002; Wagner et al. 2002; Fierer y Lennon 2011). Por lo anterior, se describirá la importancia de las comunidades bacterianas en dos hábitats diferentes en este trabajo de investigación.

1.2. Microorganismos implicados en los lixiviados de vermicomposta

La lombricomposta, vermicomposta o humus de lombriz, es el producto resultante de la transformación digestiva y metabólica de la materia orgánica (que puede ser proveniente de diversos estiércoles, vegetales, y biosólidos), mediante la acción de lombrices y microorganismos en condiciones aerobias y mesófilas (10-32 °C) (Aira et al. 2011).

Para la producción de la vermicomposta se usan los sistemas de vermicompostaje tradicional y los sistemas de vermicompostaje con alimentación continuo o flujo continuo (Garg et al. 2006). En ambos sistemas de vermicompostaje, se hace el seguimiento de la temperatura, el pH, el grado de

humedad y la aeración, esto es importante porque las lombrices requieren valores óptimos de estos parámetros para crecer y reproducirse a la mayor tasa posible, y esto permite que el procesamiento del residuo orgánico sea en menor tiempo (Garg et al. 2006).

Durante el proceso del vermicompostaje la humedad óptima entre 40 y 60 % debe mantenerse constante, esto se consigue con riegos periódicos dependiendo de la estructura del residuo y su capacidad de retención de agua. Un exceso de agua aplicada a la vermicomposta causa la putrefacción de los residuos orgánicos, ya que impide la aireación-oxigenación y crea condiciones anaerobias, esto se trata de evitar en lo posible, aunque en ciertos procesos industriales de compostaje usan la putrefacción por las bacterias anaerobias. Además, el exceso de agua causa que las formas químicas altamente solubles, liberadas tras la mineralización de los residuos orgánicos, sean arrastradas con el agua del drenaje, como el potasio que puede perderse tras el vermicompostaje (Garg y Kaushik 2005).

El material líquido colectado en los sistemas de vermicompostaje ya mencionados, se conoce como lixiviado, este producto contiene una alta concentración de sales minerales, nutrientes solubles y microorganismos, es de coloración negra-marrón y su calidad siempre depende del material inicial o sustrato, de la humedad del proceso, de la temperatura, del procedimiento que se siga cuando se lleve a cabo el proceso del compostaje y del buen mantenimiento del lixiviado cuando se almacene (Garg y Kaushik 2005).

Los lixiviados son usados por su efecto benéfico sobre los cultivos agrícolas (Fritz et al. 2012), se ha reportado que los lixiviados pueden contener factores de crecimiento y nutrientes de fácil asimilación para las plantas (Bess 2000; Atiyeh et al. 2002; Gutiérrez-Miceli et al. 2011). Otro beneficio ampliamente descrito de los lixiviados es su efecto de supresión de patógenos cuando se aplica al suelo o se usa en forma de pulverizante foliar (Scheuerell y Mahaffee 2002), para el tratamiento de enfermedades agrícolas ocasionadas por algunos microorganismos fitopatógenos (Arancon et al. 2007; Singh et al. 2008; Trujillo 2010) y para el tratamiento de residuos industriales peligrosos como los metales

pesados (Jadia y Fulekar 2008; Li et al. 2010). Así, el uso de los lixiviados se han generalizado como biofertilizantes de aplicación foliar (García et al. 2008; Gutiérrez et al. 2008; Oliva et al. 2010; Singh et al. 2010), también su aprovechamiento puede extenderse como un bioprotector que sustituya el uso de fungicidas o plaguicidas y fertilizantes sintéticos que pueden causar un impacto negativo en la calidad del cultivo y poner en riesgo a la salud humana.

Sin embargo, existen pocos reportes sobre los posibles mecanismos para la disminución de la incidencia de enfermedades en los cultivos agrícolas por uso de los lixiviados de vermicomposta. No obstante, se ha reportado que los lixiviados presentan un efecto antagónico debido a las bacterias presentes en este sustrato con capacidad de sintetizar tanto metabolitos tóxicos como antibióticos, así como presentar mecanismos de parasitismo y depredación (Trujillo 2010). La presencia de algunos de estos microorganismos no sólo incrementan los mecanismos de defensa contra fitopatógenos, sino también permiten la asimilación de algunos nutrientes, por ejemplo, mejoran la actividad micorrízica arbuscular y mejoran el desarrollo foliar debido a su actividad metabólica (Atiyeh et al. 2002; Arancon et al. 2006; Kinsella et al. 2009; Mejri et al. 2010). Así mismo, Trujillo (2010) encontró *Bacillus subtilis* en el lixiviado de vermicomposta, y demostró que este microorganismo es el agente responsable en la inhibición del crecimiento de *Aspergillus ochraceus*, que es causante de enfermedades en los cultivos de café. También, Somasekhara et al. (2011) utilizaron filtrados de vermicomposta para inhibir el crecimiento del hongo patógeno *Ceratocystis fimbriata* en cultivos de *Punica granatum* L., alcanzando hasta un 100 % de inhibición en el crecimiento de este microorganismo.

Sin embargo, no siempre se ha demostrado un efecto benéfico de los lixiviados de vermicomposta en el desarrollo de las plantas (Carballo et al. 2009; Xu et al. 2012). También se ha descrito que pueden estar presentes agentes patógenos y compuestos fitotóxicos en los lixiviados (Carballo et al 2009). Además, que los lixiviados deben ser usados con cuidado, ya que se ha demostrado en bioensayos que inhiben la germinación de semillas de *Raphanus sativus* L., *Lactuca sativa*, *Cucurbita pepo* y *Lycopersicon esculentum* Mill, (Carballo et al.

2009; Oliva-Llaven et al. 2010; Gutiérrez-Miceli et al. 2011; Xu et al. 2012).

Por esto, cabe resaltar que los microorganismos patógenos presentes en los lixiviados podrían ser peligrosos para los seres humanos cuando se aplican al suelo (Ingram y Millner 2007). A este respecto, los efectos beneficiosos y/o fitotóxicos reportados en estos compuestos, dependen de los sustratos de la vermicomposta y del proceso de preparación (Scheuerell y Mahaffee 2002). Se ha reportado un buen crecimiento de microorganismos benéficos y la supresión de microorganismos patógenos con buen almacenaje y aireación de los téis de la vermicomposta con aditivos (Ingham y Rollins 2006).

Actualmente, no existen estudios en los que caracterice la composición de las comunidades bacterianas de los lixiviados, para describir los microorganismos potencialmente responsables de algún efecto benéfico o nocivo para los cultivos agrícolas, pero es importante mencionar, que el cambio de las condiciones fisicoquímicas durante la preparación de los lixiviados es un posible componente que puede afectar a las diferentes comunidades microbianas. Es evidente que los sustratos disponibles son factores clave en la selección de las comunidades bacterianas y que éstas puedan ser responsables de los efectos benéficos o fitotóxicos de los lixiviados.

1.3. Comunidades bacterianas en suelos salinos alcalinos

La irrigación y la fertilización en los cultivos agrícolas incrementan la salinidad de los suelos en gran parte del mundo, afectando su estructura y fertilidad para el desarrollo de las plantas por su baja cantidad de materia orgánica y microorganismos presentes (Liang et al. 2005; Tejada et al. 2006), por lo tanto, los suelos salino-alcálinos constituyen uno de los problemas más serios que enfrenta la agricultura sostenible en todo el planeta. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) reporta 397 millones de hectáreas de suelos salinos en el mundo y 434 millones de hectáreas de suelos sódicos. Asimismo, estableció que de 230 millones de suelos irrigados, 40 millones de hectáreas son suelos afectados por la

salinización (corresponde al 19 %), estas últimas cifras son afectadas en menor o mayor grado por la intervención del hombre (Oldeman 1991, 1996; FAO 2000, 2002). En México, un 15 % de las 300,000 hectáreas regables está afectada por problemas de salinización y un 10 % por estancamientos de agua (Pulido-Madrigal 1994).

Es bien conocido que la salinidad en los suelos afecta la actividad, la biomasa y la composición microbiana (Gennari et al. 2007; Yuan et al. 2007; Setia et al. 2010; Chowdhury et al. 2011; Keshri et al. 2013). De acuerdo a un meta-análisis, se encontró que la composición global de las bacterias está más influenciada por la salinidad que por la temperatura, pH u otro factor físico y químico (Lozupone y Knight 2007). Valenzuela-Encinas (2009) reportó que en suelos salino-alcálinos con diferentes conductividades electrolíticas, tienen comunidades bacterianas completamente diferentes. También, que la cantidad de bacterias generalmente es baja al aumentar la cantidad de sal en el suelo (Ragab 1993). Keshri et al. (2013) observaron que la diversidad y abundancia, tanto de bacterias como arqueas, en suelos salino-alcálinos son diferentes, la filogenia molecular revela la dominancia de *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* y las arqueas fueron *Halobacteriaceae*.

Y en cuanto a la actividad bacteriana, se ha reportado que la salinidad reduce la capacidad de los microorganismos para degradar la celulosa (Setia et al. 2010; Li et al. 2012; Elmajdoub y Marschner 2013). Sin embargo, Yan y Marschner (2012) encontraron un aumento de la biomasa microbiana en un suelo salino tras la adición de residuos de *Pisum sativum*, lo que sugiere que hay un subconjunto de microorganismos que pueden responder al aumento de la disponibilidad del sustrato, incluso en ambientes altamente salinos. Esto concuerda con los estudios de Elmajdoub y Marschner (2013) donde encontraron que la adición de (una fuente de) C puede incrementar la tolerancia por parte de los microorganismos a un bajo potencial osmótico, pero también los provee de la energía necesaria para obtener mecanismos de tolerancia.

1.4. Justificación

Recientemente, los lixiviados de vermicomposta están siendo utilizados para el control de plagas y enfermedades, además para contribuir al crecimiento vegetal por su alto contenido de nutrimentos y por la presencia de algunos microorganismos benéficos, pero, también se ha observado que en algunos cultivos agrícolas afectan negativamente en el desarrollo y crecimiento de las plantas, por agentes patógenos y compuestos fitotóxicos que pueden estar presentes en los lixiviados.

Por otro lado, se ha observado que la adición de residuos vegetales al suelo salino alcalino del exlago de Texcoco con diferentes valores de CE y pH, afectan a los procesos del suelo, tales como la mineralización de la materia orgánica.

Sin embargo, no hay estudios que identifiquen la composición de las comunidades bacterianas tanto en los lixiviados derivados de la vermicomposta en diferentes tiempos de almacenamiento, como en los suelos salinos alcalinos, con el fin de identificar los microorganismos potencialmente responsables de efectos benéficos o nocivos y en la degradación de la materia orgánica. Por lo tanto, en este estudio se describe la estructura y la composición de las comunidades bacterianas usando el método de amplificación por PCR del rDNA 16S y pirosecuenciación.

1.5. Hipótesis del trabajo

H1: El tiempo del almacenamiento de los lixiviados de vermicomposta, derivados de residuos de estiércol de vaca, modifica la composición de las comunidades bacterianas presentes; a mayor tiempo disminuye la diversidad de microorganismos fitopatógenos (Capítulo 2).

H2: La mineralización de la materia orgánica de residuos vegetales modifica la composición y diversidad de las comunidades bacterianas en un suelo salino-alcalino, aumentando los microorganismos oligotróficos en una conductividad electrolítica de 17 dS m^{-1} (Capítulo 3).

1.6. Objetivos generales del trabajo

- Analizar la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas de lixiviados de vermicomposta en diferentes tiempos de almacenaje mediante el análisis del rDNA 16S (Capítulo 2).
 - Caracterizar fisicoquímicamente los lixiviados.
 - Aislar el DNA metagenómico de los lixiviados y construir librerías del rDNA 16S.
 - Estimar la diversidad taxonómica bacteriana en términos de riqueza de especies, índices de diversidad y filogenia.
 - Determinar la distribución taxonómica de las comunidades bacterianas.

- Analizar la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas de tres sitios (diferente conductividad electrolítica y pH) del suelo salino alcalino del exlago de Texcoco, con rastrojo y fracción de (hemi)celulósica (FDN) del maíz, mediante el análisis del rDNA 16S (Capítulo 3).
 - Construir librerías del rDNA 16S a partir del DNA aislado de los diferentes tratamientos.
 - Estimar la diversidad bacteriana en términos de riqueza de especies, índices de diversidad y filogenia.
 - Determinar la distribución taxonómica de las comunidades bacterianas.
 - Comparar la abundancia relativa de los grupos taxonómicos de las comunidades bacterianas de los tratamientos con la comunidad bacteriana nativa.

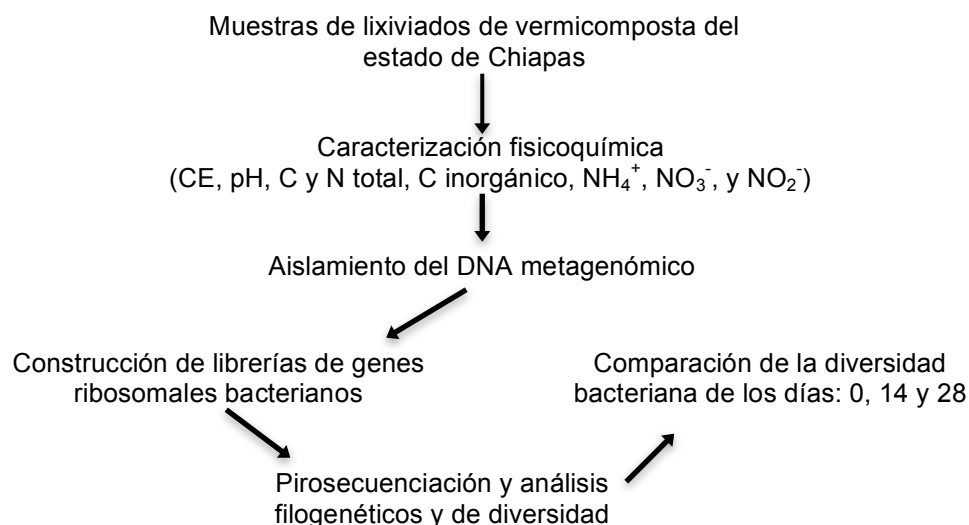
CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LIXIVIADOS DE VERMICOMPOSTA

2.1. Antecedentes

El vermicompostaje es un proceso biológico aeróbico de transformación de residuos orgánicos por la acción de lombrices, bacterias y hongos, cuyo producto final, la vermicomposta, tiene un gran valor en la agricultura (Aira et al. 2006). La vermicomposta ayuda al crecimiento de las plantas, mejora las características fisicoquímicas del suelo previniendo su erosión y reduce la dependencia de insumos externos de alto costo económico y ambiental, dando lugar a una agricultura sostenible (Kaushik et al. 2003; Chauhan et al. 2010). La fracción líquida o los lixiviados que se obtienen del proceso del vermicompostaje, contienen microorganismos y elementos nutritivos. Los lixiviados pueden ser usados como biofertilizantes líquidos o para el control de fitopatógenos (Kaushik et al. 2003; Gutiérrez et al. 2008). Sin embargo, no siempre se observa un efecto benéfico de los lixiviados en el desarrollo de las plantas (Eastman et al. 2001; Koné et al. 2010). Se ha descrito que pueden estar presentes agentes patógenos y compuestos fitotóxicos en los lixiviados. Por ejemplo, se ha observado que los lixiviados pueden inhibir la germinación y el crecimiento de algunas plantas (Carballo et al. 2009; Xu et al. 2012). En este trabajo, se estudió la composición de la comunidad bacteriana en lixiviados de vermicomposta a partir de estiércol de vaca para identificar a los microorganismos potencialmente responsables de algún efecto, ya sea benéfico o nocivo.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Esquema general de trabajo



2.2.2. Preparación de los lixiviados de vermicomposta

La producción de la vermicomposta y la colecta del lixiviado se llevaron a cabo en la granja “Luanda”, ubicada en el kilómetro 10.5 de la carretera Ocozocoautla-Villa Flores del municipio de Ocozocoautla de Espinosa en el estado de Chiapas.

La vermicomposta fue producida en tres camas (1.5 m de ancho, 6.6 m de largo y 1 m de profundidad) con lombrices de la especie *Eisenia foetida* L., y estiércol de vaca en una relación de 25 g/kg respectivamente, ambos se mezclaron mecánicamente cada 15 días durante dos meses, otros detalles del proceso de vermicompostaje se pueden encontrar en Gutiérrez-Miceli et al. (2011). El lixiviado de cada cama se colectó en tanques de 200 L, posteriormente se tomó una alícuota de 1 L de cada tanque que fueron almacenadas por separado durante 28 días.

2.2.3. Caracterización de los lixiviados

Las muestras de 1 L de los lixiviados se mantuvieron en condiciones

ambientales, a partir de estas muestras se tomaron muestras de 50 mL por triplicado (n=3) después de 0, 14 y 28 días, analizando un total de nueve muestras (n=9), es decir, tres muestras por cada tanque. Las sub-muestras se caracterizaron químicamente (CE, pH, el total de C y N, C inorgánicos y concentraciones de NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^-) como lo describe Gutiérrez-Miceli et al. (2011), también se aisló el DNA metagenómico.

2.2.4. Aislamiento del DNA metagenómico, amplificación del rDNA 16S y pirosecuenciación

Después de 0, 14 y 28 días, el DNA metagenómico se aisló a partir de las nueve muestras de acuerdo con el procedimiento presentado por Navarro-Noya et al. (2013b). La concentración de DNA metagenómico se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Suwanee, GA, EE.UU.). Las muestras fueron almacenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se usaron para la amplificación por PCR. Se usaron los iniciadores 8-F (5'-AGA GTT TGA TCI TGG CTC A-3') y 556-R (5'-TGC CAG IAG CIG CGG TAA-3') que contienen 10 pb de identificadores multiplex (MID) y adaptadores de pirosecuenciación Lib-L de Roche 454 para amplificar la región V1-V3 del gen rRNA 16S, a partir del DNA metagenómico aislado (Navarro-Noya et al. 2013a). La mezcla de PCR (25 μL) con 1 \times de buffer de reacción, 10 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (10 pmol de cada iniciador), 0.7 U de "Phusion Hot Start DNA" polimerasa de alta fidelidad (FINNZYMES) y 20 ng de DNA metagenómico, y se usó el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización inicial a $94\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min, 25 ciclos de desnaturalización a $94\text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 s, hibridación a $53\text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 s, y la extensión a $72\text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 s, seguido por un período de extensión final a $72\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Todas las muestras se amplificaron por triplicado y se purificaron utilizando el kit de purificación como recomienda el fabricante (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.). La cuantificación de los productos de la PCR se realizó usando el reactivo PicoGreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un fluoroespectrofotómetro NanoDrop™ 3300. La secuenciación se realizó con GS-FLX Titanium 454

pyrosequencer Roche (Roche, Mannheim, Alemania) en Macrogen Inc. (Servicio de Secuenciación de DNA, Seúl, Corea).

2.2.5. Análisis estadístico y análisis de las secuencias

Las secuencias fueron analizadas con el “pipeline QIIME pyrosequencing” (<http://www.qiime.org/>), donde las secuencias de baja calidad, es decir, con una longitud inferior a 200 pb, con el nivel de calidad <25, que tuvieron homopolímeros de más de 6 bases y las secuencias que tuvieron errores en el MID, en los iniciadores y en los adaptadores de la pirosecuenciación fueron excluidos de los análisis. De las secuencias seleccionadas se usaron para determinar las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) a un umbral de similitud de 97 % y una secuencia representativa de cada OTU fue tomada para el análisis adicional usando el “Uclust OTU selector” de versión 1.2.21 q (Edgar 2010). Las secuencias representativas fueron alineados a la “Greengenes” disponible en <http://greengenes.lbl.gov/> en un mínimo porcentaje de identidad de secuencia del 75 % con PyNast (Caporaso et al. 2010). Se detectaron y se eliminaron quimeras usando “ChimeraSlayer” (Haas et al. 2011). El clasificador RDP se utilizó para obtener la asignación taxonómica y la abundancia relativa de los diferentes grupos de bacterias en un umbral de confianza de 80 % (Wang et al. 2007). El índice riqueza de Chao1 (Chao y Bunge 2002) y los índices diversidad Shannon y Simpson (Shannon y Weaver 1949) también se calcularon del sub-muestreo consecutivo de la población bacteriana de cada muestra, a intervalos de 173 secuencias de entre 10 y 1740. Esta rarefacción secuencial se llevó a cabo 10 veces. El análisis de coordenadas principales (PCoA) se hizo con la matriz de distancias “pairwise UniFrac” con datos “weighted” y “unweighted” para comparar las comunidades bacterianas entre los tratamientos (Lozupone y Knight 2005). Las correlaciones entre matriz de distancia UniFrac y las determinaciones fisicoquímicas se realizaron a través de pruebas de Mantel con 999, con permutaciones con el “*compare_distance_matrices.py within QIIME*”.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Composición de las comunidades bacterianas en los lixiviados

La caracterización fisicoquímica de las muestras del lixiviado reveló que algunas propiedades se mantienen estables con el almacenamiento como nitrógeno (N), carbono total (C) y el nitrito (NO_2^-), mientras que C inorgánico, nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) aumentan (**Tabla 1**).

Tabla 1. Lixiviado obtenido de vermicomposta de estiércol de vaca almacenado por 0, 14 y 28 días.

Días	CE ^a (mS cm ⁻¹)	pH	Nitrógeno total mg/L	Carbono orgánico mg/L	Carbono inorgánico mg/L	Concentración de:		
						NO_2^-	NO_3^-	NH_4^+
0	11.4ab	9.6a	154a	1771a	611c	0.53a	2.41bc	1.15a
14	9.6b	8.7c	132a	1804a	686b	0.51a	3.44a	0.95b
28	11.6a	8.9b	81a	1844a	759a	0.44a	3.85a	0.51c
MSDc	1.2	0.1	78	568	53	0.29	0.85	0.17

a CE: Conductividad electrolítica, b Letras iguales no son significativos. MSD: Mínima diferencia significativa ($P < 0.05$).

Además se observa que el pH y CE es variable, en este sentido, se ha reportado que los lixiviados contienen una alta concentración de nutrientes vegetales, debido a la formación de sustancias químicas altamente solubles que es consecuencia de la mineralización de los residuos orgánicos durante el vermicompostaje (Garg y Kaushik, 2005), cabe resaltar, que estas formas químicas son un factor importante para el desarrollo de los cultivos agrícolas ya que son fácilmente asimiladas por las plantas a pH neutro (Azarmi et al 2008).

Por otro lado, de acuerdo a los resultados de la pirosecuenciación del rDNA 16S, para determinar la composición de las comunidades bacterianas de las muestras de lixiviados del vermicomposta durante los días de almacenamiento

después de 0, 14 y 28 días, las nueve bibliotecas produjeron 15,779 secuencias con una longitud promedio de 428 pb. Se encontraron un total de 1,958 OTUs (3 % cut-off). El estimador de riqueza Chao1 aumentó con el tiempo, mientras que generalmente, los índices de diversidad de Shannon y Simpson fueron más grandes en el día 14 que en el día 0 y 28 (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resultados del análisis de pirosecuenciación e índices de diversidad alfa.

Día	Muestra	Secuencia MID	Número de lecturas ^a	Número total de OTUs ^b	Número de OTUs a 356 lecturas	Índices		
						Chao1	Shannon	Simpson
0	1	TACGAGTATG	ND ^c	ND	ND	ND	ND	ND
	2	TACTCTCGTG	429	112	112	236	5.3	0.932
	3	TAGAGACGAG	797	228	151	350	6.2	0.964
14	1	TCGTCGCTCG	2794	476	171	444	6.7	0.982
	2	ACATACGCGT	3015	461	176	413	6.8	0.986
	3	ACGCGAGTAT	1743	473	178	464	6.8	0.985
28	1	ACTACTATGT	3175	511	169	513	6.4	0.974
	2	ACTGTACAGT	1005	331	173	551	6.7	0.978
	3	AGACTATACT	2758	480	171	444	6.5	0.979

^aLecturas de alta calidad, i.e. >200 bp de longitud, <25 % nucleótidos no resueltos (lecturas totales = 15779), ^bOTU: Unidad Taxonómica Operativa determinado por Uclust (Edgar 2010) en un umbral de similitud de 97 %, ^cND: No determinado.

Las secuencias se clasificaron en 21 *phyla* y los más importantes fueron *Proteobacteria* (51.5 %, promedio de los días 0, 14 y 28), *Actinobacteria* (15.5 %), *Tenericutes* (11.4 %), *Bacteroidetes* (4.9 %), *Chloroflexi* (1.9 %), *Firmicutes* (1.8 %) y *Planctomycetes* (1.2 %) (**Figura 1**). La abundancia de los otros *phyla* fue de <1 %, mientras que 7.9 % secuencias bacterianas se mantuvieron sin clasificar. El *phylum Proteobacteria* fue representado por cinco clases, es decir, *Alphaproteobacteria* (32.2 % media de los días 0, 14 y 28), *Betaproteobacteria*

(9.1 %), *Gammaproteobacteria* (8.9 %), *Deltaproteobacteria* (0.2 %) y *Epsilonproteobacteria* (0.2 %).

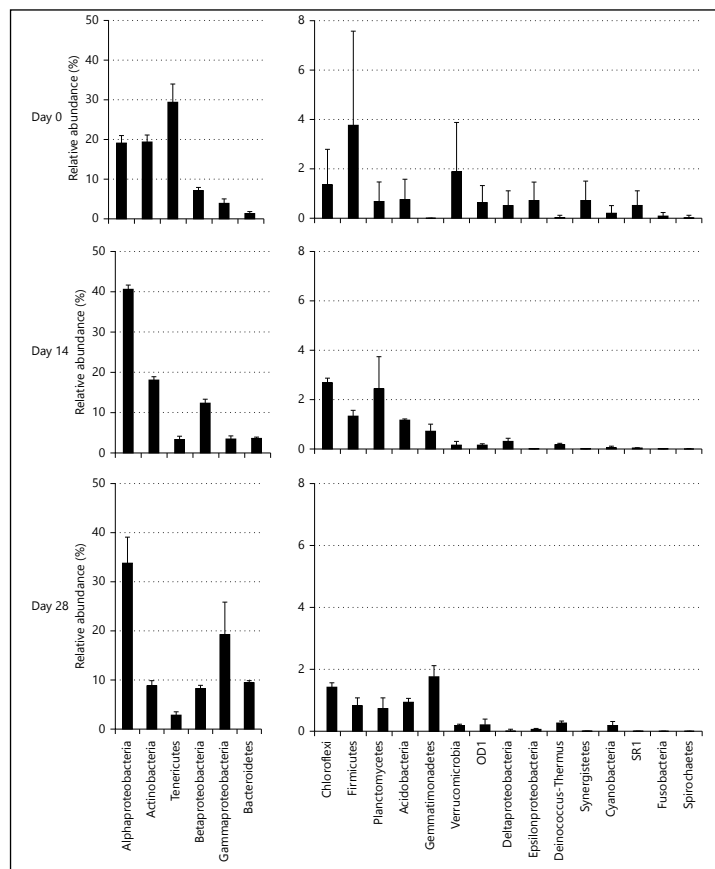


Figura 1. Distribución taxonómica a nivel de *phylum*.

En este estudio, se esperaba que la diversidad bacteriana de los lixiviados frescos (día 0) se parecieran entre sí. Algunos estudios mencionan que las bacterias no cultivables pertenecientes a los *Acidobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gammaproteobacteria* y *Gemmatimonadetes* dominan la comunidad bacteriana en vermicomposta, basándose en el análisis del rDNA 16S (Fracchia et al. 2006; Yasir et al. 2009). Como tal, se encontró que las *Proteobacterias* pueden ser el *phylum* dominante en la vermicomposta como se encontró en el lixiviado. Las bacterias en el lixiviado fresco incluyen *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacterias*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, (alfa, beta, gamma

y delta) *Proteobacteria*, *Tenericutes* y *Verrucomicrobia*, taxones que son comunes en los suelos (Wessén et al. 2010; Nemergut et al. 2011; Navarro-Noya et al. 2013a). Además, los taxones alfa, beta y gamma-*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* son comúnmente dominantes en el intestino de la lombriz (Singleton et al. 2003; Wüst et al. 2011; Bernard et al. 2012).

2.3.2. Fitopatógenos en los lixiviados

La población bacteriana en el lixiviado fresco, es decir, en el día 0, fue dominada por *Mollicutes* (*Tenericutes*), como el género *Acholeplasma* (Figura 2 y 3). Después de 14 días, la abundancia de los *Mollicutes* y *Actinomycetales* disminuyó, mientras que los *Rhizobiales* se convirtieron en el grupo dominante de bacterias en el lixiviado almacenado durante 14 días (Figura 2).

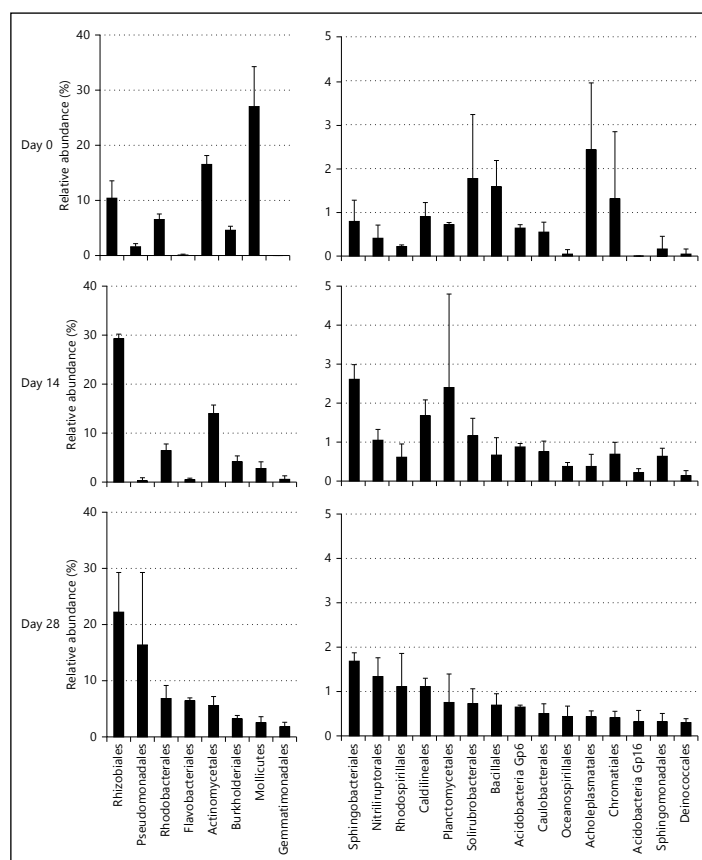


Figura 2. Distribución taxonómica a nivel de orden.

El material usado para el vermicompostaje también podría determinar la estructura de la comunidad bacteriana de los lixiviados. Los altos porcentajes de *Tenericutes* (clase *Mollicutes*) detectados en el lixiviado podrían venir del estiércol de vaca. En particular, el género *Acholeplasma* (clase *Mollicutes*) se encuentra en gran porcentaje. *Acholeplasma*, *Spiroplasma* y micoplasmas fueron detectados en compostaje y vermicompostaje preparado con estiércol de gallinaza (Tiquia et al. 2005; Sasaki et al. 2009), de aguas residuales, ganado y mataderos (Watabe y Ogata. 1979), y en aves de corral (Marois et al. 2002). *Acholeplasma* es un micoplasma ampliamente distribuido en la naturaleza y se caracteriza por poseer capacidades de adaptación muy versátiles (Chernov et al. 1996). Entre todas sus capacidades ecológicas, es un agente causal de algunas enfermedades de las plantas (Chernov et al. 2007; 2011). Con características de virulencia exitosas hacia plantas (infectividad, invasividad, toxicidad y persistencia) sugieren que *Acholeplasma* pueden sobrevivir en condiciones desfavorables como el estrés oxidativo, sustrato limitado y las fluctuaciones de temperatura (Chernov et al. 2011). Se ha propuesto que la fitotoxicidad es uno de los criterios más importantes para la evaluación de la idoneidad de los lixiviados para aplicaciones de plantas (Tang et al. 2006; Carballo et al. 2009; Xu et al. 2012). Sin embargo, la aplicación de lixiviados al suelo extiende los fitopatógenos. El destino del patosistema (agente patógeno y la planta hospedante) no puede ser completa en los suelos o plantas donde se aplica los lixiviados. Sin embargo, los insectos se consideran como vectores de micoplasma entre las plantas (Lee et al. 2000). Además, *Acholeplasma* puede invadir las plantas a través del sistema de la raíz intacta (Chernov et al. 1996). En el control de enfermedades fitoplásmicas, la principal preocupación es la prevención que el tratamiento. La propagación de los fitoplasmas se ha logrado controlar mediante el control de los insectos vectores y mediante la aplicación de determinadas prácticas culturales para eliminar las fuentes de fitoplasmas (Lee et al. 2000). Por lo tanto, la aplicación de lixiviados que contengan fitoplasmas en el suelo, podría ser de gran preocupación. Después de 28 días de almacenamiento, el lixiviado contiene significativamente menor abundancia de *Mollicutes* y *Acholeplasma*. Parece que el almacenamiento de los lixiviados

se necesita antes de su aplicación, para reducir los niveles de microorganismos potencialmente patógenos. Sin embargo, estamos reportando la abundancia relativa. Una cuantificación absoluta sería necesaria para conocer el número de estos microorganismos contenidos en los lixiviados. Otros géneros que se encuentran en el lixiviado que contienen agentes patógenos también fueron *Mycobacterium*, *Paracoccus* y *Pseudomonas*.

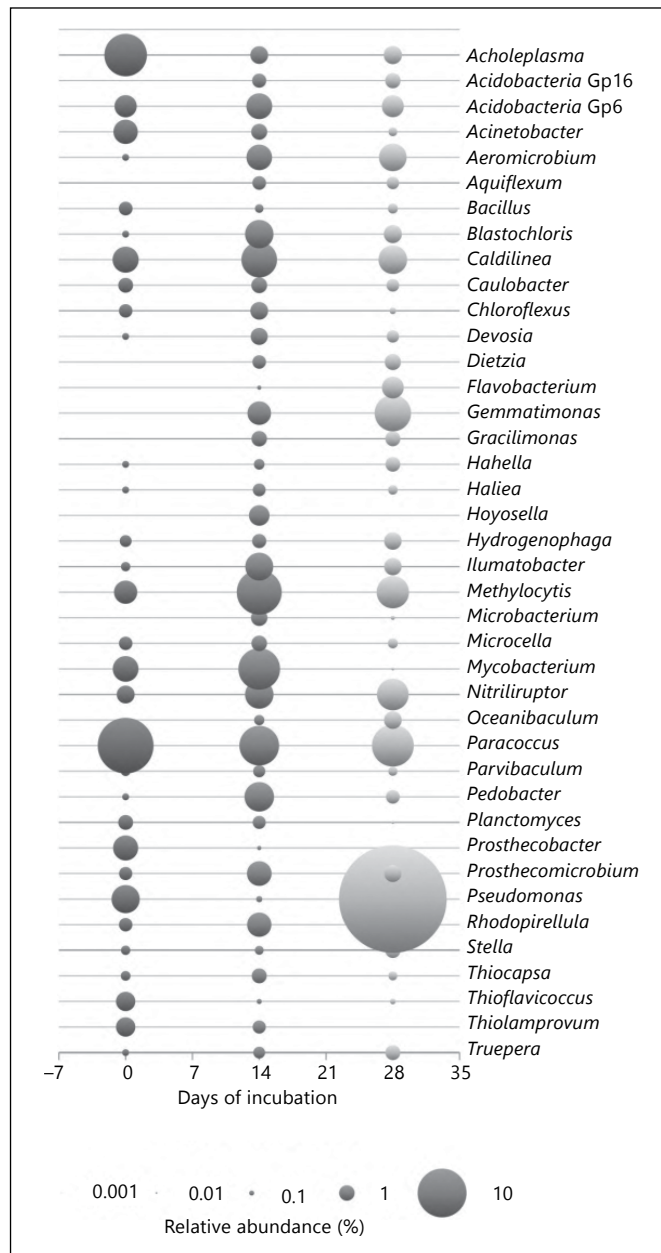


Figura 3. Distribución taxonómica a nivel de género (los más abundantes i.e.>%).

2.3.3. Cambios en las comunidades bacterianas durante el almacenamiento de los lixiviados

Después de 28 días, la abundancia de las *Rhizobiales* se mantuvo alta, pero los filotipos pertenecientes a los *Pseudomonadales* se convirtieron en dominantes. Por consiguiente, las comunidades bacterianas en el lixiviado después de 0 y 14 días, se separaron claramente utilizando tanto “unweighted UniFrac” y “weighted UniFrac” (Figura 4).

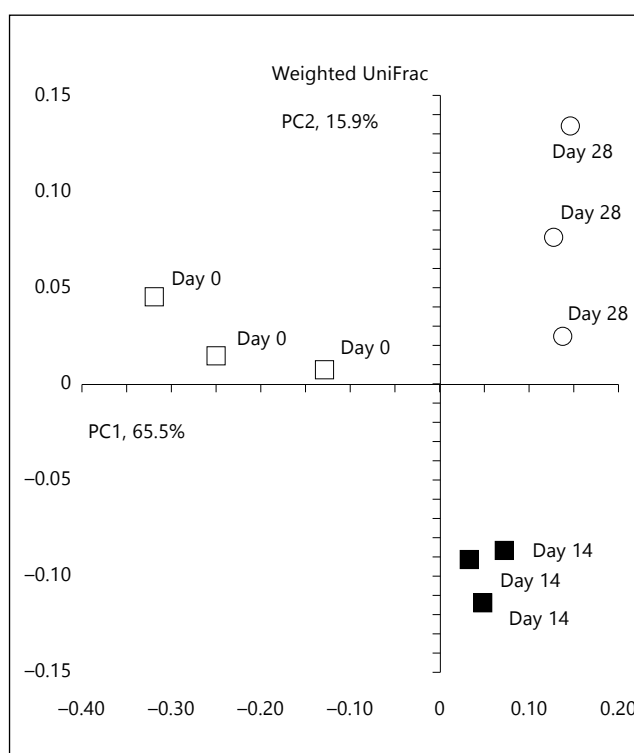


Figura 4. Análisis “weighted UniFrac” de las comunidades bacterianas en lixiviados de vermicomposta en el día 0 (□), día 14 (■) y día 28 (○).

En diferentes etapas de maduración de la vermicomposta, las comunidades bacterianas cambiaron (Sen y Chandra 2009). Sin embargo, las comunidades bacterianas en el proceso de compostaje, al parecer, son más estables (Vaz-Moreira et al. 2008) en comparación con lo que ocurrió con las comunidades bacterianas en el lixiviado. A pesar de que la diversidad bacteriana sigue siendo similar con el tiempo, la estructura de la comunidad bacteriana cambió

profundamente, como se refleja en el análisis “UniFrac”. Estos cambios en el tiempo fueron explicados por las características fisicoquímicas de los lixiviados. El rápido cambio de las condiciones fisicoquímicas durante el almacenamiento de los lixiviados son propensos a conducir la sucesión de las comunidades bacterianas. La composición bacteriana sobre la base de información filogenética demuestra que las propiedades químicas como amonio, nitrato y el contenido de carbono inorgánico se correlacionaron significativamente con la composición bacteriana. Es evidente que los cambios en los sustratos disponibles en el lixiviado son los principales impulsores de las poblaciones bacterianas, cambiando así la estructura de la comunidad.

Es difícil deducir directamente las propiedades funcionales de los microorganismos basándose en las secuencias ribosomales detectados en este estudio, ya que muchos de ellos no podían estar en un estado metabólicamente activo (Chen y Murrell 2010). Sin embargo, algunos géneros bacterianos podrían estar asociados con las actividades antifúngicas o el crecimiento de las plantas que de vez en cuando caracterizan a los lixiviados. El grupo más importante fue *Pseudomonadales* (*Pseudomonas*), que alberga especies que pueden inhibir el crecimiento de patógenos, por ejemplo, la pudrición de la raíz de la remolacha causada por *Sclerotium rolfsii* (Thilagavathi et al. 2012), donde se ha reportado que la combinación del microorganismo *Pseudomonas fluorescens* con *Trichoderma* TTH1 o *Bacillus subtilis* reduce la enfermedad. Sin embargo, *Pseudomonas syringae* es el agente etiológico de enfermedades graves en una amplia gama de plantas de cultivo importantes (O'Brien et al. 2011).

El segundo grupo en importancia son las bacterias pertenecientes a los *Actinomycetales* (*Actinobacteria*). Los *Actinomycetales* son pertenecientes a *Actinobacteria* y son muy diversos. Los géneros identificados en el lixiviado, es decir *Aeromicrobium*, *Dietzia* y *Mycobacterium* tienen la capacidad de degradar la celulosa. Un tercer grupo importante identificado en el lixiviado fue el orden *Rhizobiales* (*Alphaproteobacteria*). *Rhizobiales* alberga muchos microorganismos considerados *rizobacterias*, promotoras del crecimiento

vegetal (PGPR). Muchos géneros pertenecientes a *Rhizobiales* se conocen como fijadores de nitrógeno y también descritos como productores de sideróforos, ácido indolacético, solubilizantes de fósforo (Abd-Alla 1994; Wittenberg et al. 1996; Antoun et al. 2004), y se utilizan con frecuencia como PGPR (Khan, 2005). A pesar de que la abundancia de los *Bacillales* fue baja, todavía puede ser importante para el control de patógenos. Compuestos antifúngicos como surfactina son producidos por *Bacillus subtilis* (Dunlap et al. 2013) y iturina A es producida por *Bacillus amyloliquefaciens* (Mochizuki et al. 2012). Vaz-Moreira et al. (2008) informaron que las cepas del género *Bacillus* fueron los más abundantes en una vermicomposta producida a partir de desperdicios de cocina.

2.4. Conclusiones del Capítulo

En conclusión, este es el primer estudio que describe la estructura de las comunidades bacterianas usando el método de pirosecuenciación del rDNA 16S de lixiviados de vermicomposta a partir de residuos de estiércol de vaca. Se ha explicado el efecto benéfico o fitotóxico muy variable que presentan los lixiviados de acuerdo a la composición de las comunidades bacterianas, es decir, los cambios de abundancia de estos microorganismos durante el almacenaje, como los *Mollicutes* (microorganismos fitopatógenos) que se encuentran en los lixiviados frescos pero su abundancia va disminuyendo con el almacenaje.

CAPÍTULO 3. EFECTO DEL RASTROJO Y DE LA FRACCIÓN DE (HEMI)CELULÓSICA DEL MAÍZ EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE UN SUELO SALINO ALCALINO

3.1. Antecedentes

El suelo salino y extremadamente alcalino del antiguo lago de Texcoco presenta un pH en un rango de 9.8 a 11.7 y una conductividad electrolítica (CE) de 22 a 150 dS m⁻¹ (Beltrán-Hernández et al. 1999; Dendooven et al. 2010). Estos valores son el resultado de las aguas subterráneas salobres que llegan regularmente a la superficie del suelo y también por presentar una alta evaporación. En algunas partes del antiguo lago drenado, la CE decae a <1 dS m⁻¹ y el pH a <9, por lo tanto, estas características en este tipo de suelo lo hacen ser único, por lo que nos permite estudiar cómo los cambios en la CE y el pH afectan a los diferentes procesos del suelo, tales como la mineralización de la materia orgánica (Luna-Guido et al. 2003), la desnitrificación (Ruiz-Romero et al. 2009), y las poblaciones microbianas como las bacterias (Valenzuela-Encinas et al. 2008, 2012) y arqueas (Valenzuela-Encinas et al. 2009).

Por otro lado, se ha reportado que la salinidad en los suelos inhibe la mineralización y la degradación de la celulosa (Elmajdoub y Marschner 2013; Al-Busaidi et al. 2014), sin embargo, Luna-Guido et al. (2003) estudiaron que con el uso de maíz marcado con el isótopo ¹⁴C, demostraron que la fracción de (hemi)celulósica fue mineralizada en el suelo con una CE de 32,7 dS m⁻¹ y un pH de 9.8 (Luna-Guido et al. 2003), pero no quedó claro, cuáles fueron los microorganismos involucrados en la degradación de esta materia orgánica.

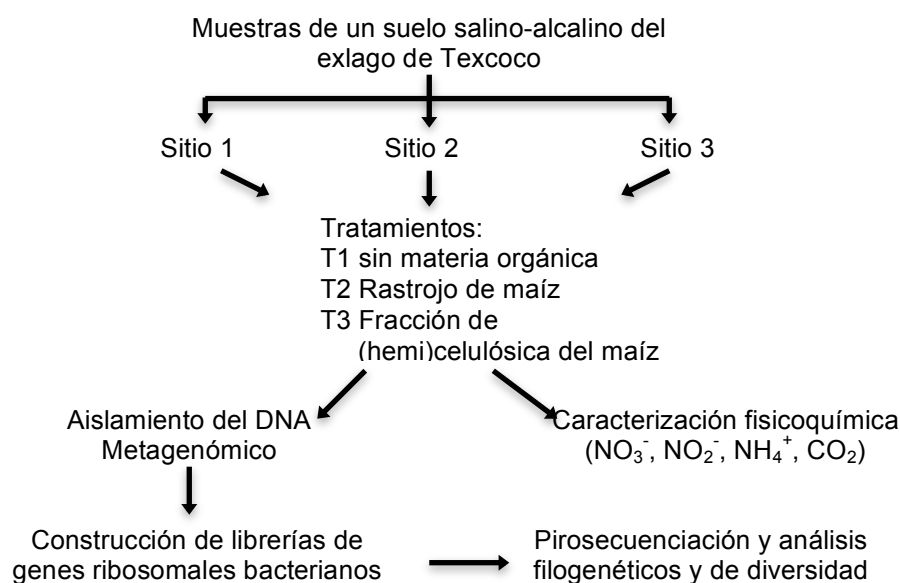
No obstante, se ha logrado aislar microorganismos del suelo del exlago de Texcoco que son capaces de degradar celulosa, como *Cellulomonas bogoriensis* y *Nocardiopsis dassonvillei* (López-Ramírez 2013). Sin embargo, las técnicas de aislamiento limitan la identificación de todos los microorganismos presentes en este tipo de ecosistema, además de que sólo proporcionan una idea de su funcionalidad. Por lo tanto, las técnicas

moleculares, como la pirosecuenciación del rDNA 16S, proporcionan un estudio más detallado de la estructura de las comunidades microbianas presentes.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es: i) estudiar cómo la estructura de la comunidad bacteriana se verá afectada por la variación de la CE y el pH, ii) identificar los microorganismos implicados en la degradación de los residuos de maíz y su fracción de (hemi)celulósica, y iii) cómo la variación de la CE y el pH, afectará a los microorganismos implicados en la degradación de maíz y su fracción de (hemi)celulósica.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Esquema general de trabajo



3.2.2. Descripción del sitio de estudio

Las muestras de suelo fueron colectadas en tres sitios con una área de 400 m² cada una, del exlago de Texcoco, el cual está ubicado al noroeste de la ciudad de México, a una altitud de 2240 m.s.n.m., con una temperatura anual media de 16 °C y con una precipitación anual de 705 mm.

Se colectaron 30 kg de suelo a una profundidad de 15 y 20 cm para cada sitio por triplicado, las nueve muestras de suelo fueron tamizadas y caracterizadas fisicoquímicamente como indica la **Tabla 3**.

Tabla 3. Características de los tres sitios de estudio.

Salinidad	pH	CE ^a dS m ⁻¹	CRA ^b	C	C	N	Arcilla	Limo	Arena
				orgánico	inorgánico	total			
(g kg ⁻¹)									
Bajo	9.3	1.9	690	35	0.7	1.6	160	130	710
Medio	10.4	17.3	730	33	0.5	3.2	220	40	740
Alto	10.3	33.4	600	29	0.8	1.7	520	290	190

^a CE: conductividad electrolítica, ^b CRA: capacidad de retención de agua.

3.2.3. Incubación aerobia, tratamientos con rastrojo y fracción de (hemi)celulósica de maíz

Para el cultivo de las plantas de maíz se usó una cámara de acrílico de 150 L (35 cm × 50 cm de superficie y 60 cm de alto). Las semillas de maíz (*Zea mays* L.) se desinfectaron con 0.06 % (v/v) de hipoclorito de sodio durante 12 min y se lavaron con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas en placas de agar al 0.8 % y para inducir la etiolación y se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 48 h. Las plántulas de maíz con raíces de aproximadamente de 2 cm se colocaron en vermiculita estéril en una cámara de crecimiento y se les agregó una solución nutritiva de Steiner (1961). Después de 25 días, las plantas fueron cosechadas, secadas y caracterizadas, obteniendo N total de 34 g kg⁻¹, C de 422 g kg⁻¹, fracción soluble de 599 g kg⁻¹, lignina de 25.4 g kg⁻¹, (hemi)celulósica de 311 g kg⁻¹, polifenoles de 2.4 g kg⁻¹ y un contenido de cenizas de 62.2 g kg⁻¹.

Para la obtención de la fracción de (hemi)celulósica (FDN) del maíz, las plantas se fraccionaron de acuerdo con el método de Van Soest (Van Soest 1963; Van Soest y Wine 1967). El cual consistió en la extracción con una solución de detergente neutro que elimina la parte soluble del residuo de maíz, dejando una

fibra detergente neutro que contiene la mayor parte de los componentes de la pared celular, es decir, la (hemi)celulósica, además de algunos componentes de lignina (Ruíz-Valdiviezo et al. 2010). La FDN tuvo un contenido de 19 g kg^{-1} de N y 405 g kg^{-1} de C.

Por otro lado, los suelos de los tres sitios se preincubaron con 40 % de la CRA durante siete días, en recipientes de 1000 L conteniendo un frasco de 1 L con 1 M de NaOH para atrapar el CO_2 y un frasco de 1 L con agua destilada para evitar la desecación del suelo. Posteriormente, quince submuestras de 25 g de cada suelo ($n=9$) se agregaron a frascos de vidrio de 120 mL por separado. De las cuales, cinco muestras fueron mezcladas con rastrojo, cinco con FDN del maíz y cinco muestras sin modificaciones, que sirvieron como control. La cantidad de rastrojo y FDN fue de $2 \text{ mg de C kg}^{-1}$ aproximadamente. Los frascos de vidrio se colocaron por separado dentro de frascos de 1 L con 10 mL de agua destilada para evitar la desecación y con matraces de 25 mL con 20 mL de 1 M de NaOH para atrapar el CO_2 desprendido. Los frascos fueron cerrados herméticamente y almacenados en oscuridad a $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 14 días. Después de 0, 1, 3, 7, 14 días, se abrió un frasco de cada tratamiento ($n=3$), de cada sitio ($n=3$) y por réplica ($n=3$), los matraces con NaOH fueron también removidos pero fueron cerrados herméticamente hasta su posterior análisis. Se usaron quince gramos de suelo para calcular la concentraciones de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) con 100 mL de K_2SO_4 con una concentración de 0.5 M. El suelo restante (aproximadamente 10 g) se usó para la extracción del DNA metagenómico.

3.2.4. Aislamiento del DNA metagenómico, amplificación del rDNA 16S y pirosecuenciación

El DNA metagenómico se aisló después de 0, 1, 3, 7 y 14 días, a partir de 114 muestras, usando el siguiente protocolo: la muestra de suelo fue lavada con una solución de pirofosfato de sodio a 0.15 M y de buffer de fosfato a 0.15 M para eliminar la materia orgánica (Ceja-Navarro et al. 2010). Se usaron tres diferentes técnicas de lisis celular. Cada técnica fue usada para extraer cuatro

veces 0.5 g de suelo (un total de 2 g de suelo) que fue mezclado para obtener una mezcla común. Un total de 6 g de suelo fueron extraídos por triplicado (18 g de suelo). La primera técnica que se utilizó fue la de Valenzuela-Encinas et al. (2008) que consistió en la lisis celular química y un choque térmico. La segunda fue la técnica de Sambrook y Rusell (2001), que consistió en la lisis enzimática de la células, y la tercera fue la de Hoffman y Winston (1987) que usa una solución de detergente para lisis celular. La precipitación de las proteínas y purificación de DNA fueron descritas por Valenzuela-Encinas et al. (2008). El pool de DNA metagenómico de cada muestra se purificó con el kit de “GE Healthcare Life Sciences” de acuerdo a las instrucciones del proveedor y la concentración de DNA metagenómico se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Suwanee, GA, EE.UU.). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta que se usaron para la amplificación por PCR.

Los iniciadores 8-F (5'-AGA GTT TGA TCI TGG CTC A-3') y 949-R (5'-CCGTCW ATT KCT TTG AGT T -3') que contienen 10 pb de identificadores (MID) y adaptadores de pirosecuenciación Lib-L de Roche 454, se usaron para amplificar la región V1-V6 del rDNA 16S a partir del DNA metagenómico (Navarro-Noya et al. 2013b). La mezcla de PCR (25 µL) contenía 1× de buffer de reacción, 10 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato, 10 pM de cada iniciador, 0.7 U de “Phusion Hot Start DNA” polimerasa de alta fidelidad (FINNZYMES) y 20 ng de DNA metagenómico. Se usó el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 45 s, hibridación a 55 °C durante 45 s, y la extensión a 72 °C durante 45 s, seguido por un período de extensión final a 72 °C durante 10 min. Todas las muestras se amplificaron por triplicado y se purificaron usando el kit de purificación como recomienda el fabricante (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.). La cuantificación de los productos de la PCR se realizó usando el reactivo PicoGreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un fluoroespectrofotómetro NanoDrop™ 3300. La secuenciación se realizó usando un pirosecuenciador GS-FLX Titanium 454 Roche (Roche, Mannheim, Alemania) por MacroGen Inc. (Servicio de secuenciación de DNA, Seúl, Corea).

3.2.5. Análisis estadístico y análisis de las secuencias

Las secuencias fueron procesadas a través de “QIIME pyrosequencing pipeline” (<http://www.qiime.org/>). Las secuencias de baja calidad, es decir, de longitud inferior a 200 pb, con el nivel de calidad <25, que contiene homopolímeros de más de 6 bases y las secuencias con errores en MID, iniciadores y adaptadores de la pirosecuenciación fueron excluidas de los nuevos análisis. Las secuencias seleccionadas se usaron para determinar las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) a un umbral de similitud de 97 % y una secuencia representativa de cada OTU fue tomada para el análisis adicional usando el Uclust OTU selector de versión 1.2.21q (Edgar 2010). Las secuencias quiméricas fueron detectadas usando “Chimera Slayer” (Haas et al. 2011). Las secuencias representativas de cada OTU fueron alineadas con “Greengenes core set” disponible en <http://greengenes.lbl.gov/> en un mínimo porcentaje de identidad de secuencias de 75 % con PyNast (Caporaso et al. 2010). El clasificador RDP se usó para obtener la asignación taxonómica y la abundancia relativa de los diferentes grupos de bacterias en un umbral de confianza de 80 % (Wang et al. 2007).

Se evaluó el índice de riqueza de Chao1 (Chao y Bunge 2002) y los índices de diversidad Shannon y Simpson (Shannon y Weaver 1949) de cada muestra en intervalos de 173 secuencias de entre 10 y 1740. Esta rarefacción secuencial se llevó a cabo 10 veces. El análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizó con la matriz de distancias “pairwise UniFrac” con datos “weighted” y “unweighted” para comparar las comunidades bacterianas entre los tratamientos (Lozupone y Knight 2005). Las correlaciones entre matriz de distancia “UniFrac” y las determinaciones fisicoquímicas se realizaron a través de pruebas de Mantel con 999 con permutaciones con el “*compare_distance_matrices.py within QIIME*”. El CCA fue analizado usando PROC CANCORR del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc. 1989).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Efecto de la variación de la CE y el pH sobre las comunidades bacterianas en tres sitios diferentes del suelo salino alcalino

El suelo salino alcalino del exlago de Texcoco se caracterizó por presentar una gran variación en el número de los grupos bacterianos de diferentes niveles taxonómicos. Encontrando los phylotipos pertenecientes a 29 *phyla* diferentes, es decir, alrededor de 100 clases, 180 órdenes y 440 géneros, además, se encontró que la estructura de las comunidades bacterianas fue diferente entre los diferentes suelos.

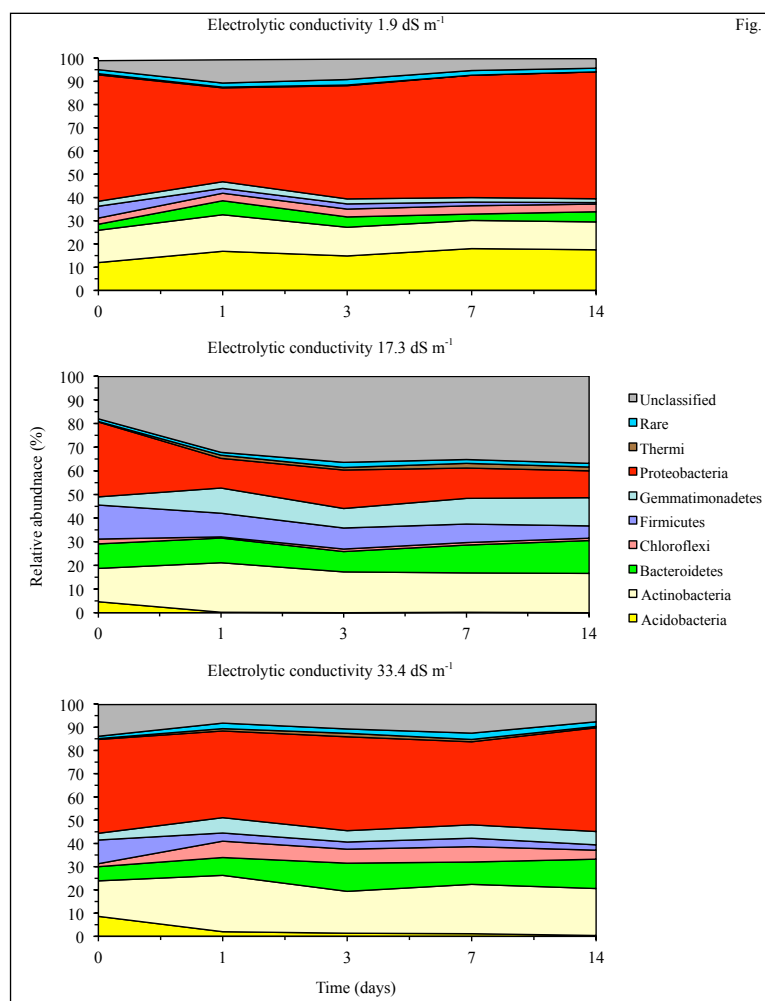


Figura 5. Abundancia relativa (%) de los *phyla* más importantes, las bacterias no determinadas y la suma de los que presentan una abundancia relativa de <1 % de tres suelos con diferentes conductividades electrolíticas del exlago de Texcoco.

En el suelo nativo (sin tratamiento) con una CE de 1.9 dS m^{-1} , se encontró que la bacteria *Proteobacteria* (50 %) fue el más abundante seguido por *Acidobacteria* (16.2 %) y *Actinobacteria* (13.1 %). En el suelo nativo con una CE de 17.2 dS m^{-1} , *Actinobacteria* (17.0 %) fue el más abundante, seguido por *Proteobacteria* (16.2 %), pero el 32.3 % de las secuencias, no se pudieron clasificar. Y por último, en el suelo nativo con una CE de 33.4 dS m^{-1} , *Proteobacteria* (39.2 %) fue el más abundante, seguido por *Actinobacteria* (20.3 %) y *Bacteroidetes* (9.5 %) como se indica en la **Figura 5**.

Por lo tanto, debido a las diferencias en la abundancia relativa de *phyla* y de los diferentes suelos, el análisis de PCA separa claramente los tres suelos el exlago de Texcoco (**Figura 6**).

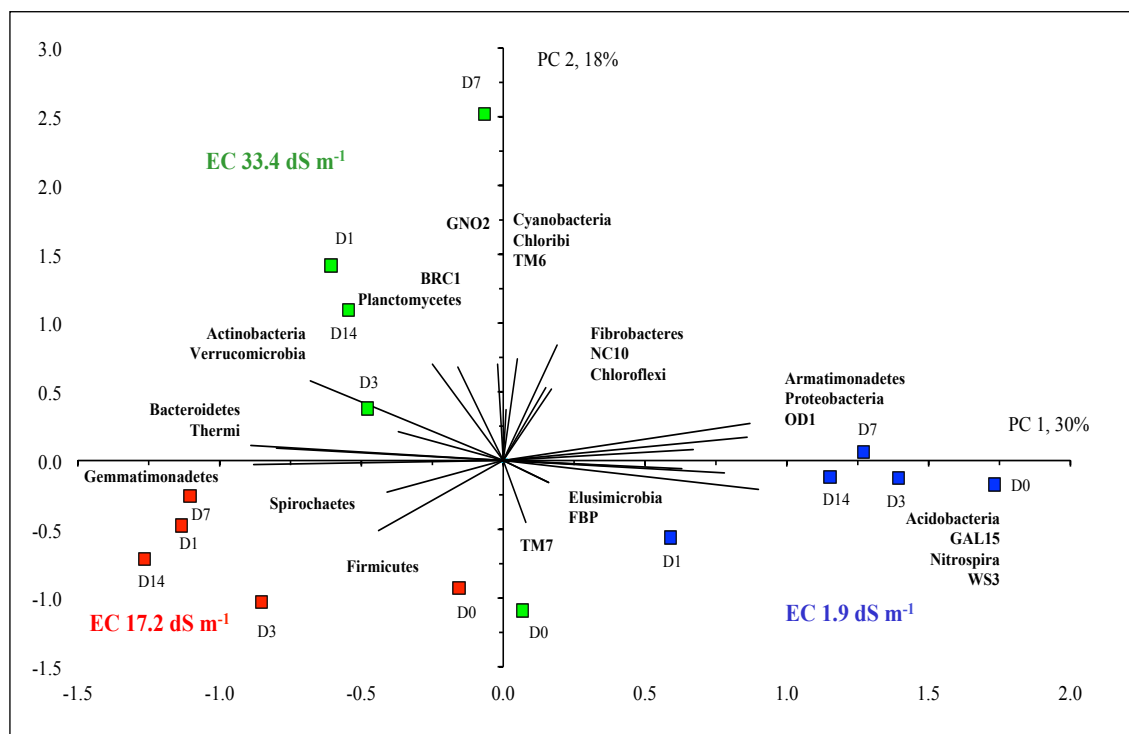


Figura 6. Análisis de los componentes principales teniendo en cuenta la abundancia relativa (%) de los diferentes *phyla* bacterianos en los suelos nativos del exlago de Texcoco con CE de 1.9 dS m^{-1} (■), 17.2 dS m^{-1} (■) y 33.4 dS m^{-1} (■), día cero (D0), día uno (D1), día tres (D3), día siete (D7) y día catorce (D14).

El suelo nativo con CE 1.9 dS m^{-1} se caracterizó con un PC1 positivo (mayor abundancia relativa de *Acidobacteria* y *Proteobacteria*), y un PC2 positivo y negativo. El suelo nativo con CE 17.2 dS m^{-1} fue caracterizado por un PC1 negativo (mayor abundancia relativa de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*) y con un PC2 negativo (mayor abundancia relativa de *Firmicutes*). El suelo nativo con una CE de 33.4 dS m^{-1} fue un PC1 negativo, pero en su mayoría presentó un PC2 positivo (mayor abundancia relativa de *Cyanobacteria* y *Chloroflexi*). El análisis de PCA en las abundancias relativas de las diferentes clases, órdenes y géneros también separó claramente los tres suelos nativos (datos no presentados).

Por otro lado, el análisis CCA también separa claramente a los diferentes suelos (**Figura 7**). El suelo nativo franco arenoso con un CE de 1.9 dS m^{-1} y pH de 9.3 fue caracterizado como un CC1 negativo (mayor abundancia relativa de *Acidobacteria* y *Proteobacteria*).

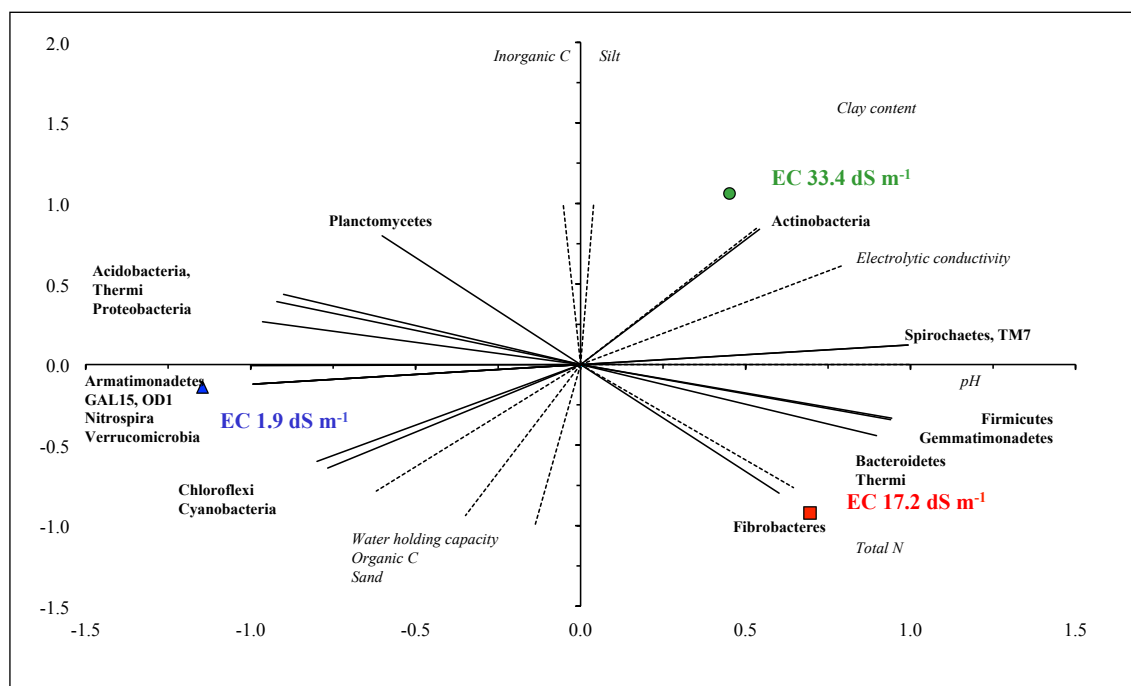


Figura 7. Análisis de correlación canónica considerando los porcentajes de los diferentes *phyla* y las características de los suelos sin tratamiento con CE de 1.9 dS m^{-1} (■), de 17.2 dS m^{-1} (■) y 33.4 dS m^{-1} (■) en el día cero.

El suelo nativo franco arcillo arenoso con una CE de 17.2 dS m^{-1} y pH de 10.4 fue caracterizado como un CC1 positivo (pH alto) y con un CC2 negativo (baja CE con más N por lo que favorece a los *Bacteroidetes* y *Firmicutes*). Y el suelo nativo arcilloso con CE de 33.4 dS m^{-1} y pH de 10.3 también fue caracterizado como un CC1 negativo pero con un CC2 positivo que favorece a *Actinobacteria*.

En el suelo nativo con CE de 17.2 dS m^{-1} fue dominado por los phylotipos de *Nitriliruptoraceae* (*Actinobacteria*). Sorokin et al. (2009) encontraron el microorganismo *Nitriliuptor alkaliphilus* que es moderadamente tolerante a la salinidad, en sedimentos de un lago salino, este organismo proviene de la familia de *Nitriliruptoraceae*. La abundancia relativa de esta familia fue baja (4.7 %) en los suelos con alta CE (33.4 dS m^{-1}), confirmando que puede ser moderadamente tolerante a las concentraciones de sal. El genero KSA1 (*Bacteroidetes*) también parece ser moderadamente tolerante a la sal, porque la abundancia relativa de esta bacteria muestra un patrón similar a *Nitriliruptoraceae*. Este grupo de bacterias fue encontrada en los suelos nativos con CE de 17.2 dS m^{-1} en una relación de 8.9 %, siendo el segundo género más abundante, y sólo 5.3 % en el suelo nativo con CE de 33.4 dS m^{-1} y el 0.8 % en el suelo nativo con CE de 1.9 dS m^{-1} .

También se observó que la alta salinidad favoreció a los phylotipos pertenecientes al genero de *Halomonas* (*Gammaproteobacteria*). Este género fue el más abundante (15.3 %) en el suelo nativo con alta CE (33.4 dS m^{-1}) y su abundancia relativa fue cinco veces mayor que en los suelos nativos con CE de 17.2 (3.0 %) y 1.9 dS m^{-1} (2.9 %). Oueriaghli et al. (2014) estudiaron la diversidad y la distribución de *Halomonas* en Rambla Salada, que es un entorno hipersalino en España, reportando que la mayor diversidad de este género se encontró cuando la salinidad fue mayor, también estos microorganismos pertenecientes a este género se han aislado del suelo del exlago de Texcoco (Soto-Padilla et al. 2014).

3.3.2. Mineralización del carbono y los cambios de la estructura de las comunidades bacterianas

Con la aplicación del rastrojo y la fracción (hemi)celulósica (FDN) del maíz, la emisión del CO₂ aumentó en cada suelo (**Figura 8**). Después de los 14 días, la emisión del CO₂ en suelos tratados con estos residuos de maíz fue significativamente más alta en el suelo con CE de 1.9 dS m⁻¹ en comparación con los otros suelos.

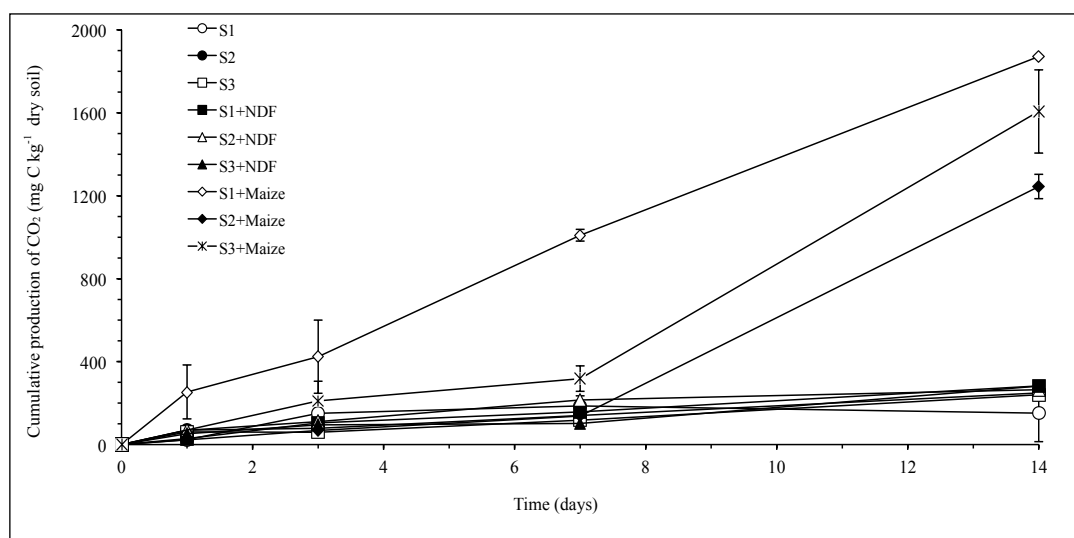


Figura 8. Emisión de CO₂ en los tratamientos: con rastrojo y FDN de maíz en los diferentes tipos de los suelos del exlago de Texcoco.

También, la aplicación de la materia orgánica cambió la estructura de las comunidades bacterianas (**Figura 9**), observándose una disminución en la abundancia relativa de *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* en comparación con el control. Estos *phyla* bacterianos se encuentran generalmente en entornos con pocos nutrientes y disminuyen en ambientes ricos de materia orgánica, es decir, estos microorganismos se describen como poblaciones de ecosistemas oligotróficos. Además, se ha reportado que este tipo de microorganismos (*Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*) fueron significativamente más abundantes en suelos con poco material orgánico en comparación con la

rizósfera (enriquecida por exudados y material de raíces) (Eichorst y Kuske 2012; Peiffer et al. 2013). También se observó, que la composta madura es un entorno preferido para *Planctomyces* y *Chloroflexi*, conteniendo una cantidad mínima de materia orgánica que el compostaje fresco (De Gannes et al. 2013) Por otro lado, *Chloroflexi* también se ha descrito como una población de ecosistemas oligotróficos en el suelo (Fuerst 1995; Fierer et al. 2006).

En el suelo con CE de 1.9 dS m^{-1} , la abundancia relativa de *Acidobacteria* disminuye al aumentar la CE, en el suelo nativo presenta 16.1 %, con el rastrojo de maíz a 8.3 % y cuando se aplica el FDN a 3.0 %. Pero este efecto no se observa en los suelos con alta CE porque la abundancia relativa de *Acidobacteria* en estos suelos fue baja. En general, la aplicación de la materia orgánica disminuye la abundancia relativa de 16 diferentes clases y 23 géneros.

Sin embargo, la aplicación del rastrojo de maíz en cada suelo, aumenta la abundancia relativa de *Actinomycetales* (*Actinobacteria*) y el genero *Bacillus* (*Firmicutes*). Es bien conocido que *Actinobacteria* son los primeros colonizadores en la rizósfera del maíz (Li et al. 2014) y también se encarga de degradar la materia orgánica en el suelo (Semenov et al. 2012) de manera que es normal que su abundancia relativa aumente en el suelo con materia orgánica y muchas de las especies que pertenecen a *Actinobacteria* degradan macromoléculas, como lignina, celulosa, quitina, y en parte, el almidón (Suela-Silva et al. 2013).

Por otro lado, la abundancia relativa del género *Prauseria* (*Nocardiopsaceae*, *Actinomycetales*) aumentó en los suelos con diferente CE. En el tratamiento con FDN presentó un incremento >3.5 veces y con el tratamiento de rastrojo de maíz aumento >13 veces. Aunque, se tiene poca información sobre este género (Zhou et al. 1996), en el suelo con rastrojo de maíz con CE de 33.4 dS m^{-1} se convirtió en el segundo género más dominante (15.7 %), después del género *Halomonas* (16.2 %). Ambos phylotipos parecen estar implicados en la degradación de la materia orgánica en el suelo con CE de 33.4 dS m^{-1} .

Aunque la abundancia relativa de *Firmicutes* no se vió afectada significativamente por la aplicación de la materia orgánica, pero la abundancia

relativa de algunos géneros de este phyla como *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Planomicrobium*, fue significativamente mayor en presencia del rastrojo de maíz en comparación con la suelo control.

Por otro lado, con la aplicación de FDN, aumentó la abundancia relativa de *Xanthomonadeae* y *Pseudomonadeae* (*Gammaproteobacteria*) y *Proteobacteria* en comparación con los demás tratamientos ($P < 0,01$). Los grupos bacterianos de *Gammaproteobacteria* fueron los más afectados por la aplicación de este tipo de materia orgánica.

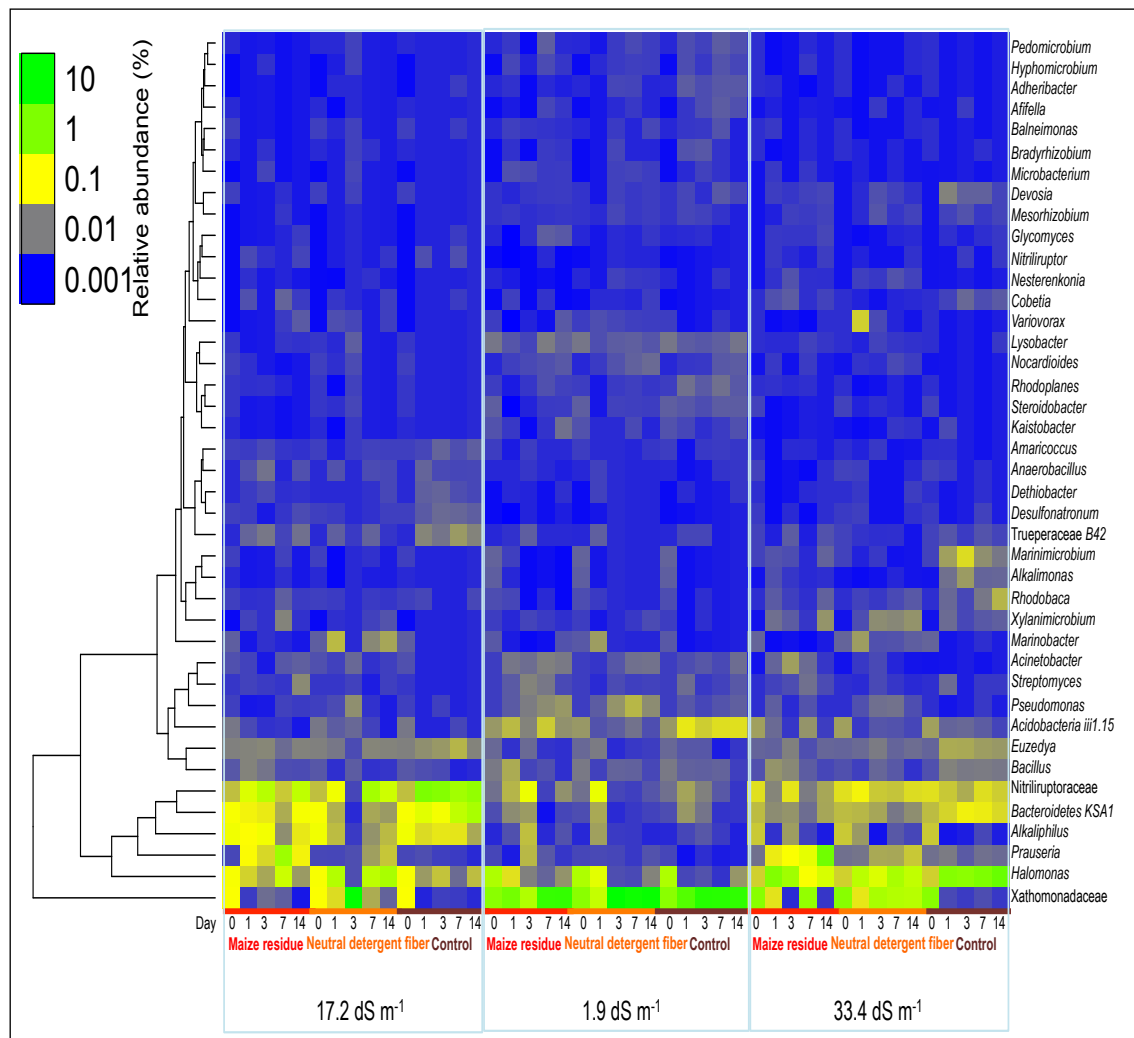


Figura 9. Abundancia relativa (%) de los grupos bacterianos más importantes en los tres suelos del exlago de Texcoco con diferentes conductividades electrolíticas, sin tratamiento (control) y con rastrojo y FDN de maíz (tratamientos), en el día cero (0), día uno (1), día tres (3), día siete (7) y día catorce (14).

Con el análisis de PCA se confirmó que la aplicación de materia orgánica tuvo un profundo efecto sobre la estructura de las comunidades bacterianas (**Figura 10**). Primero, la aplicación de FDN cambió más la estructura que el rastrojo de maíz. Segundo, el efecto de la materia orgánica sobre la estructura de las comunidades bacterianas fue muy similar en cada tipo de suelo, independientemente sus características. Tercero, la aplicación de la materia orgánica aumentó la abundancia relativa de pequeños grupos bacterianos, por ejemplo, en el tratamiento con rastrojo de maíz aumentó la abundancia relativa de *Actinobacteria* y con FDN aumentó *Proteobacteria*, pero en ambos se redujo la abundancia relativa de una gran parte de grupo de bacterias. Cuarto, las comunidades bacterianas se parecían más entre sí después de la aplicación de la materia orgánica, por ejemplo, el valor de PC1 y PC2 disminuyen y son más negativos con los cambios en los suelos de CE de 17.2 dS m⁻¹ y en los suelos con CE de 1.9 dS m⁻¹.

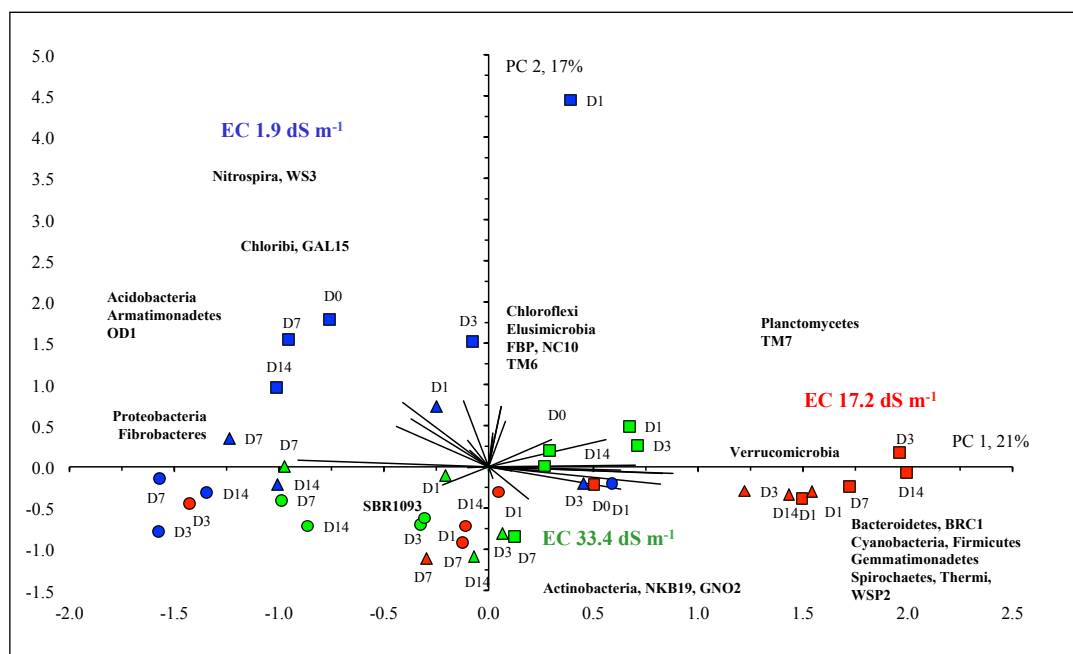


Figura 10. Análisis de los componentes principales teniendo en cuenta los porcentajes de los diferentes *phyla* en los suelos del exlago de Texcoco, con CE de 1.9 dS m⁻¹, sin tratamiento (■), rastrojo de maíz (▲), FDN de maíz (●); con CE de 17.2 dS m⁻¹, suelo sin tratamiento (■), rastrojo de maíz (▲), FDN (●) y con CE de 33.4 dS m⁻¹, suelo sin tratamiento (■), rastrojo de maíz (▲) FDN (●), día cero (D0), día uno (D1), día tres (D3), día siete (D7) y día catorce (D14).

3.4. Conclusiones del Capítulo

La estructura de las comunidades bacterianas en los tres suelos de Texcoco fue distinta, no obstante, la aplicación de la materia orgánica (rastrajo y (hemi)celulósica de maíz) aumenta o disminuye la abundancia relativa de la mayoría de los grupos bacterianos. Como la aplicación de FDN en los diferentes suelos, aumentó la abundancia relativa de *Xanthomonadeae* y *Pseudomonadeae*, y con la aplicación del rastrajo de maíz favoreció la abundancia relativa de *Nocardiopsaceae* (género *Prauseria*). Sin embargo, se observó una disminución en la abundancia relativa de *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*, que pertenecen a poblaciones de ecosistemas oligotróficos cuando se aplicó la materia orgánica.

En conclusión, este trabajo describe como la aplicación de materia orgánica disminuye la abundancia relativa de poblaciones bacterianas nativas de los diferentes ecosistemas oligotróficos.

RECOMENDACIONES

Los resultados de esta tesis es la descripción de la composición de las comunidades bacterianas en diferentes ecosistemas, sin embargo, estamos reportando la abundancia relativa, por lo tanto, es necesario hacer una cuantificación absoluta para conocer el número de estos microorganismos contenidos en los diferentes ecosistemas (lixiviados de vermicomposta y de los suelos salinos alcalinos).

También, es importante identificar las poblaciones bacterianas que participan activamente en procesos metabólicos específicos en cada uno de los ambientes estudiados mediante pruebas como Stable isotope probing (SIP), o como los biomarcadores FAG, rRNA.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Alla M.H. (1994) Solubilization of rock phosphates by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Folia Microbiol.* **39**:53–56.
- Aira M., Gómez-Brandón M., González-Porto P., Domínguez J. (2011) Selective reduction of the pathogenic load of cow manure in an industrial-scale continuous-feeding vermireactor. *Bioresource Technol.* **20**:9633–37.
- Aira M., Monroy F., Domínguez J. (2006) Changes in microbial biomass and microbial activity of pig slurry after the transit through the gut of the earthworm *Eudrilus eugeniae*. *Biol. Fertil. Soils* **42**:371–376.
- Al-Busaidi K.T.S., Buerkert A., Joergensen R.G. (2014) Carbon and nitrogen mineralization at different salinity levels in Omani low organic matter soils. *J. Arid. Environments.* **100**:106–110.
- Antoun H., Beauchamp C.J., Goussard N., Chabot R., Llande R. (2004) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes. *Plant Soil* **204**:57–67.
- Arancon N., Edwards C., Dick R., Dick L. (2007) Vermicompost tea production and plant growth impacts. *BioCycle* 51–52.
- Arancon N., Edwards C., Lee S., Byrne R. (2006) Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. *Europ. Jour. Soil Biol.* **42**:S65–S69.
- Aronson A., Shai Y. (2001) Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS. Microbiol. Lett.* **195**:1–8.
- Atiyeh R.M., Lee S., Edwards C.A., Arancon N.Q., Metzger J.D. (2002) The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technol.* **84**:7–14.
- Azarmi R., Giglou M., Taleshmikail R. (2008) Influence of vermicompost on soil chemical and physical properties in tomato (*Lycopersicum esculentum*) field. *Afric. Jour. Biotech.* **7**:2397–2401.
- Beltrán-Hernández R.I., Coss-Muñoz E., Luna-Guido M.L., Mercado-García F., Siebe C., Dendooven L. (1999) Carbon and nitrogen dynamics in alkaline saline soil of the former Lake Texcoco (Mexico) as affected by application of sewage sludge. *Eur. J. Soil Sci.* **50**:601–608.
- Bernard L., Chapuis-Lardy L., Razafimbelo T., Razafindrakoto M., Pablo A.L., Legname E., Poulain J., Bröls T., O'Donohue M., Brauman A., Chotte J.L., Blanchart E. (2012) Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. *ISME. J.* **6**:213–222.

- Bess V.H. (200) Understanding compost tea. *Biocycle* 10–71.
- Caporaso J.G., Bittinger K., Bushman F.D., DeSantis T.Z., Andersen G.L., Knight R. (2010) PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* **26**:266–267.
- Carballo T., Gil M.V., Calvo L.F., Morán A. (2009) The influence of aeration system, temperature and compost origin on the phytotoxicity of compost tea. *Compost Sci. Util.* **17**:127–139.
- Ceja-Navarro J.A., Rivera F.N., Patino-Zuniga L., Govaerts B., Marsch R., Villa-Sanjurjo A., Dendooven L. (2010) Molecular characterization of soil bacterial communities in contrasting zero tillage systems. *Plant soil* **329**:127–137.
- Chao A., Bunge J. (2002) Estimating the number of species in a stochastic abundance model. *Biometrics*. **58**:531–539.
- Charlop-Powers Z., Milshteyn A. Brady S.F. (2014) Metagenomic small molecule discovery methods. *Curr. Opin. Microbiol.* **19**:70–75
- Chattopadhyay A., Bhatnagar N., Bhatnagar R. (2004) Bacterial insecticidal toxins. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**:33–54.
- Chauhan A., Kumar S., Singh A., Gupta M. (2010) Vermicomposting of vegetable wastes with cowdung using three earthworm species *Eisenia foetida*, *Eudrilus eugeniae* and *Perionyx excavatus*. *Nat. Sci.* **8**:33–43.
- Chen Y., Murrell J.C. (2010) When metagenomics meets stable-isotope probing: progress and perspectives. *Trends. Microbiol.* **8**:157–163.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Medvedeva E.S., Mouzykantov A.A., Ponomareva A.A., Shaymardanova G.F., Gorshkov O.V., Trushin M.V. (2011) Unadapted and adapted to starvation *Acholeplasma laidlawii* cells induce different responses of *Oryza sativa*, as determined by proteome analysis. *J. Proteomics.* **74**:2920–2936.
- Chernov V.M., Gogolev Y.V., Popova N.V., Chernova O.A. (1996) Infections of *Pisum sativum* of *Acholeplasma laidlawii* PG8 lead to change of morphological and physiological features of plants. *Dokl. Acad. Sci.* **348**:428–30.
- Chernov V.M., Moukhametshina N.E., Gogolev Y.V., Nesterova T.N., Trushin M.V., Chernova O.A. (2007) *Acholeplasma laidlawii* PG8 culture adapted to unfavorable growth conditions shows an expressed phytopathogenicity. *Sci World J.* **7**:1–6.
- Chowdhury N., Marschner P., Burns R. (2011) Response of microbial activity and community structure to decreasing soil osmotic and matric potential. *Plant Soil* **344**:241–254.

de Gannes, V., Eudoxie G., Hickey W. J. (2013) Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing. *Bioresource Technol.* **133**:573–580.

Dendooven L., Alcántara-Hernández R.J., Valenzuela-Encinas C., Luna-Guido M., Perez-Guevara F., Marsh R. (2010) Dynamics of carbon and nitrogen in an extreme alkaline saline soil: a review. *Soil Biol. Biochem.* **42**:865–877.

Dunlap C.A., Bowman M.J., Schisler D.A. (2013) Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: a biocontrol antagonist of *Fusarium* head blight. *Biol. Control* **64**:166–75.

Eastman B., Kane P., Edwards C., Trytek L., Gunadi B., Stermer A., Mobley J. (2001) The effectiveness of vermiculture in human pathogen reduction for USEPA biosolids stabilization. *Compost Sci. Utilization* **9**:38–49.

Edgar R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**:2460–2461.

Eichorst S.A., Kuske C.R. (2012) Identification of cellulose-responsive bacterial and fungal communities in geographically and edaphically different soils by using stable isotope probing. *Appl. Environ. Microb.* **78**:2316–2327.

Elmajdoub B., Marschner P. (2013) Salinity reduces the ability of soil microbes to utilize cellulose. *Biol. Fertil. Soils* **49**:379–386.

FAO. Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-Affected Soils. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy 2000.

FAO. The Salt of the Earth: Hazardous for Food Production. World Food Summit, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy 2002.

Fierer N., Jackson R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:626–631.

Fierer N., Lennon J.T. (2011) The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *Am. J. Bot.* **98**: 439–448..

Fracchia L., Dohrmann A.B., Martinotti M.G., Tebbe C.C. (2006) Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 942–952.

Fredrickson J.K., Zachara J.M., Balkwill D.L., Kennedy D.L.S.W., Kostandarithes H.M. Daly M.J. Romine M.F., Brockman F. (2004) Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, Washington sate. *Appl. Environ. Microb.* **70**:4230–4241.

Fritz J.I., Franke-Whittle I.H., Haindl S., Insam H., Braun R. (2012)

Microbiological community analysis of vermicompost tea and its influence on the growth of vegetables and cereals. *Can. J. Microbiol.* **58**:836–847.

Fuerst J.A. (1995) The *Planctomycetes* emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology* **7**:1493–1506.

García R., Dendooven L., Gutiérrez F. (2008) Vermicomposting leachate (worm tea) as liquid fertilizer for maize (*Zea mays* L.) forage production. *Asian. Jour. Plant Sci.* **7**: 360–367.

Garg P., Gupta A., Satya S. (2006) Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: a comparative study. *Bioresource. Technol.* **97**:391–395.

Garg V.K., Kaushik P. (2005) Vermistabilization of textile mill sludge spiked with poultry droppings by an epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *Bioresource Technol.* **96**:1063–1071.

Gennari M., Abbate C., La Porta V., Baglieri A., Signetti A. (2007) Microbial response to Na₂SO₄ additions in a volcanic soil. *Arid. Land. Res. Manag.* **21**:211–227.

Gutiérrez F., García R., Rincón R., Abud M., Oliva M., Guillen M., Dendooven L. (2008) Formulation of a liquid fertilizer for sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) using vermicompost leachate. *Biores. Tech.* **99**:6174–6180.

Gutiérrez-Miceli F.A., Oliva-Llaven M.A., Mendoza-Nazar P., Ruíz-Sesma B., Alvarez-Solis J.D., Dendooven L. (2011) Optimization of vermicompost and wormbed leachate for the organic cultivation of radish. *J. Plant Nutr.* **34**:1642–53.

Haas B.J., Gevers D., Earl A.M., Feldgarden M., Ward D.V., Giannoukos G., Ciulla D., Tabbaa D., Highlander S.K., Sodergren E., Methé B., DeSantis T.Z., Petrosino J.F., Knight R., Birren B.W. (2011) Human microbiome consortium chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* **21**:494–504.

Hagedorn S., Kaphammer B. (1994) Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:773–800.

Handelsman J., Liles M., Mann D., Riesenfeld C., Goodman R. M. (2002) Cloning the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world. *Method. Microbiol.* **33**:241–255.

Hofman C.S., Winston F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**:267–272.

Hoshino T., Noda N., Tsuneda S., Hirata A., Inamori Y. (2001) Direct detection by in situ PCR of the amoA gene in biofilm resulting from a nitrogen removal

process. Appl. Environ. Microbiol. **67**:5261–5266.

Ingham E.R., Rollins C.A. (2006) Actively aerated compost teas. In Adding biology for soil and hydroponic systems. Nature Technologies, LLC, Sonoma U.S.A. pp 93.

Ingram D.T., Millner P.D. (2007) Factors affecting compost tea as a potential source of *Escherichia coli* and *Salmonella* on fresh produce. J. Food Protect. **70**:828–834.

Jadia C., Fulekar M. (2008) Phytoremediation: the application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. Environ. Engin. Manag. Jour. **7**:547–558.

Johnson M., Lucey J. (2006) Major technological advances and trends in cheese. J. Dairy. Sci. **89**:1174–8.

Kaushik P., Garg V.K. (2003) Vermicomposting of mixed solid textile mill sludge and cow dung with the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. Bioresource Technol. **90**:311–316.

Keshri J., Mishra A., Jha B. (2013) Microbial population index and community structure in saline-alkaline soil using gene targeted metagenomics. Microbiol. Res. **168**: 165–173.

Khan A.G. (2005) Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. J Trace. Elem. Med. Biol. **8**:355–364.

Kinsella K., Schulthess C., Morris T., Stuart J. (2009) Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. Soil Biol. Biochemist. **41**:374–379.

Koné S.B., Dionne A., Tweddell R.J., Antoun H., Avis T.J. (2010) Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. Biol. Control **52**:167–173.

Lee I.M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. (2000) Phytoplasma: phytopathogenic *Mollicutes*. Annu. Rev. Microbiol. **54**:221–55.

Li L., Xu Z., Wu J., Tian G. (2010) Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm *Eisenia foetida* in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. Biores. Tech. **101**:3430–3436.

Li X., Yuan H., Yang J., Li B. (2013) Genome sequence of the polyphosphate-accumulating organism *Arthrobacter* sp. strain PAO19 isolated from maize rhizosphere soil. Genome Announc. **1**:e00566–13.

Li X.G., Shi X.M., Wang D.J., Zhou W. (2012) Effect of alkalized magne-sic salinity on soil respiration changes with substrate availability and incubation

time. Biol. Fertil. Soils **48**:1–6.

Liang Y., Nikolic M., Peng Y., Chen W., Jiang Y. (2005) Organic manure stimulates biological activity and barley growth in soil subject to secondary salinization. Soil Biol. Biochem. **37**:1185–1195.

Liese A., Filho M. (1999) Production of fine chemicals using biocatalysis. Curr. Opin. Biotechnol. **10**:595–603.

López Ramírez P. (2013) Aislamiento de microorganismos extremófilos a partir de un suelo salino-alcalino del exlago de Texcoco y detección de sus genes celulolíticos. Tesis de Maestría, Dpto. de Biotecnología CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Lozupone C.A., Knight R. (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. **71**:8228–35.

Lozupone C.A., Knight R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **104**:11436–11440.

Luna-guido M.L., Vega-Estrada J., Ponce-Mendoza A., Hernandez-Hernandez H., Montes-Horcasitas M.C., Vaca-Mier M., Dendooven L. (2003) Mineralization of C-14 labelled maize in alkaline saline. Plant Soil. **250**:29–38.

Madsen E.L. (2005) Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. Nat. Rev. Microbiol. **3**:439–446.

Marois C., Savoye C., Kobisch M., Kempf I. (2002) A reverse transcription-PCR assay to detect viable *Mycoplasma synoviae* in poultry environmental samples. Vet. Microbiol. **89**:17–28.

McCaig A.E., Glover L., Prosser J.I. (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and diversity of unimproved and improved upland grass pastures. Appl. Environ. Microbiol. **65**:1721–1730.

Mejri D., Gamalero E., Tombolini R., Musso C., Massa N., Berta G., Souissi T. (2010) Biological control of great brome (*Bromus diandrus*) in durum wheat (*Triticum durum*): specificity, physiological traits and impact on plant growth and root architecture of the fluorescent *pseudomonas* strain X33d. BioControl. **55**:561–572.

Mochizuki M., Yamamoto S., Aoki Y., Suzuki S. (2012) Isolation and characterisation of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Biocontrol Sci. Technol. **22**:697–709.

Navarro-Noya Y.E., Gómez-Acata S., Montoya-Ciriaco N., Rojas-Valdes A., Suárez-Arriaga M., Valenzuela-Encinas C., Jiménez-Bueno N., Verhulst N., Govaerts B., Dendooven L. (2013a) Relative impacts of tillage, residue

management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biol. Biochem.* **65**:86–95.

Navarro-Noya Y.E., Suárez-Arriaga M.C., Rojas-Valdes A.M., Montoya-Ciriaco N., Gómez-Acata S., Fernández-Luqueño F., Dendooven L. (2013b) Pyrosequencing analysis of the bacterial community in drinking water Wells. *Microb. Ecol.* **66**:19–29.

Nelson K.E. (2013) Microbiomes. *Microb. Ecol.* **65**:916–919.

Nemergut D.R., Costello E.K., Hamady M., Lozupone C., Jiang L., Schmidt S.K., Fierer N., Townsend A.R., Cleveland C.C., Stanish L., Knight R. (2011) Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ. Microbiol.* **13**:135–144.

Neves L.C., Miyamura T.T., Moraes D.A., Penna T.C., Converti A. (2006) Biofiltration methods for the removal of phenolic residues. *Appl. Biochem. Biotechnol. Spring.* **129-132**:130–52.

Nübel U., García-Pichel F., Kuhl M., Muyzer G. (1999) Spatial scale and diversity of *benthic cyanobacteria* and diatoms in a salina. *Hydrobiologia* **401**:199–206.

O'Brien H.E., Thakur S., Guttman D.S. (2011) Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**:269–289.

Oldeman L. R. (1991) Global extent of soil degradation. *ISRIC. Bi-Annual. Report.* 19–36

Oliva M., Rodríguez L., Mendoza P., Ruiz B., Álvarez J., Dendooven L., Gutiérrez F. (2010) Optimization of worm-bed leachate for culturing of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) inoculated with *Glomus fasciculatum* and *Pseudomonas fluorescens*. *Elect. Jour. Biotech.* **13**:1–8.

Oueriaghli N., Gonzalez-Domenech C.M., Martinez-Checa F., Muyzer G., Ventosa A., Quesada E., Bejar V. (2014) Diversity and distribution of *Halomonas* in Rambla Salada, a hypersaline environment in the southeast of Spain. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **87**: 460–474

Peiffer J.A., Spor A., Koren O., Jin Z., Tringe S.G., Dangl J.L., Buckler E.S., Ley R.E. (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *PNAS.* **110**: 6548–6553.

Pulido Madrigal L. (1994) Anexo Técnico: Estudio general de salinidad analizada. CNA-IMTA, Cuernavaca.

Ragab M. (1993) Distribution pattern of soil microbial population in salt-affected soils. Towards the rational use of high salinity tolerant plants. **1**:467–472.

Rappé M.S., Giovannoni S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:369–94.

Rondon M., Goodman M., Handelsman J. (1999) The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends. Biotechnol.* **17**:403–409.

Ruiz-Romero E., Alcantara-Hernandez R., Cruz-Mondragon C., Marsch R., Luna-Guido M., Dendooven L. (2009) Denitrification in extreme alkaline saline soils of the former lake Texcoco. *Plant Soil* **319**:1–2.

Ruiz-Valdiviezo M.V., Luna-Guido M., Galzy A., Gutierrez-Miceli F.A., Dendooven L. (2010) Greenhouse gas emissions and C and N mineralization in soils of Chiapas (Mexico) amended with leaves of *Jatropha curcas*. *L. Applied. Soil Ecol.* **46**:17–25.

Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual.* , 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY, eds.

SAS Institute Inc. (1989). *SAS/STAT User's Guide: Version 6, Fourth Edition, Volume 2*, Cary NC: SAS Institute Inc.

Sasaki H., Nonaka J., Otawa K., Kitazume O., Asano R., Sasaki T., Nakai Y. (2009) Analysis of the structure of the bacterial community in the Livestock manure-based composting process. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **22**:113–118.

Scheuerell S.J., Mahaffee W.F. (2002) Compost tea: principles and prospects for plant disease control. *Comp. Sci. Util.* **10**:313–338.

Semenov A.V., Silva M.C.P.E., Szturc-Koestsier A.E., Schmitt H., Salles J.F., van Elsas J.D. (2012) Semenov, impact of incorporated fresh C-13 potato tissues on the bacterial and fungal community composition of soil. *Soil Biol. Biochem.* **49**:88–95.

Sen B., Chandra T.S. (2009) Do earthworms affect dynamics of functional response and genetic structure of microbial community in a lab-scale composting system?. *Bioresource Technol.* **100**:804–811.

Setia R., Marschner P., Baldock J., Chittleborough D. (2010) Is CO₂ evolution in saline soils affected by an osmotic effect and calcium carbonate?. *Biol. Fertil. Soils* **46**:781–792.

Shannon C.E., Weaver W. (1949) The mathematical theory of information. *T. Tech. J.* **27**:359–423.

Singh R., Gupta R., Patil R., Sharma R., Asrey R., Kumar A., Jangra K. (2010) Sequential foliar application of vermicompost leachates improves marketable fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Sci. Hortic. Amsterdam* **124**:34–39.

Singh R., Sharma R., Kumar S., Gupta R., Patil R. (2008) Vermicompost substitution influences growth, physiological disorders, fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Dutch.) Biores. Technol. **99**:8507–8511.

Singleton D.R., Hendrix P.F., Coleman D.C., Whitman W.B. (2003) Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (*Lumbricidae*; *Oligochaeta*). Soil Biol. Biochem. **35**:1547–1555.

Somasekhara Y., Kale R., Hosmath J. (2011) Effect of culture filtrates of vermicompost against pomegranate (*Punica granatum* L.) wilt pathogen, *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. Res. Crops. **12**:217–221.

Sorokin D.Y., van Pelt S., Tourova T.P., Evtushenko L.I. (2009) *Nitriliruptor alkaliphilus* gen. nov., sp nov., a deep-lineage haloalkaliphilic actinobacterium from soda lakes capable of growth on aliphatic nitriles, and proposal of *Nitriliruptoraceae* fam. nov and *Nitriliruptorales* ord. nov. Int. J. Syst. Evol. Micr. **59**:248–253.

Soto-Padilla M.Y., Valenzuela-Encinas C., Dendooven L., Marsch R., Gortares-Moroyoqui P., Estrada-Alvarado M.I. (2014) Isolation and phylogenetic identification of soil *haloalkaliphilic* strains in the former Texcoco Lake. Int. J. Environ. Heal. Real. R. **24**:82–90.

Steiner A.A. (1961) A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant Soil **15**:134–154.

Suela-silva M., Naves-Sales A., Teixeira-Magalhães-Guedes K., Ribeiro-Dias D., Schwan R.F. (2013) Brazilian Cerrado soil *Actinobacteria* ecology. Biomed Res. Int. **2013**:503805.

Tang J.C., Maie N., Tada Y., Katayama A. (2006) Characterization of the maturing process of cattle manure compost. Process Biochem. **41**:380–389.

Tejada M., Garcia C., Gonzalez J.L., Hernandez M.T. (2006) Use of organic amendment as a strategy for saline soil remediation: influence on the physical, chemical and biological properties of soil. Soil Biol. Biochem. **38**:1413–1421

Thilagavathi R., Rajendran L., Nakkeeran S., Raguchander T., Balakrishnan A., Samiyappan R. (2012) Vermicompost-based bioformulation for the management of sugar beet root rot caused by *Sclerotium rolfsii*. Arch. Phytopath Plant Prot. **45**:2243–2250.

Tiedje, J.M., Asuming-Brempong S., Nüsslein K., Marsh T.L., Flynn S.J. (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. Appl. Soil Ecol. **13**:109–122.

Tiquia S.M., Ichida J.M., Keener H.M., Elwell D.L., Burt Jr E.H., Michel Jr F.C. (2005) Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S

rDNA genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**:412–419.

Torsvik V., Øvreås L., Thingstad T.F. (2002) Prokaryotic diversity magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* **296**:1064–1066.

Trujillo Y. (2010) Evaluación de lixiviados de vermicomposta en la nutrición y sanidad de café orgánico. Tesis de Maestría, de Centro en IBQ, ITTG-Tuxtla, Gutiérrez, Chiapas.

Valenzuela-Encinas C., Alcantara-Hernandez R.J., Estrada-Alvarado I., Zavala-Díaz de la Serna F.J., Dendooven L., Marsch R. (2012) The *Archaeal* diversity and population in a drained alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Geomicrobiol. J.* **29**:18–22.

Valenzuela-Encinas C., Neria-González I., Alcántara-Hernández R.J., Estrada-Alvarado I., Zavala-Díaz de la Serna F.J., Dendooven L., Marsch R. (2009) Changes in the bacterial population of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (México) following flooding. *Extremophiles.* **13**:609–621.

Valenzuela-Encinas C., Neria-González I., Alcántara-Hernández R.J., Enríquez-Aragón J.A., Estrada-Alvarado I., Hernández-Rodríguez C., Dendooven L., Marsch R. (2008) Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles.* **12**:247–254.

Van Soest P.J. (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Ass. Offic. Agr. Chem.* **46**:829–35.

Van Soest P.J., Wine R. H. (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assn. Offic. Anal. Chem.* **50**:50–5.

Vaz-Moreira I., Silva M.E., Manaia C.M., Nunes O.C. (2008) Diversity of bacterial isolates from commercial and homemade composts. *Microb. Ecol.* **55**:714–22.

Wagner M., Loy A., Nogueira R., Purkhold U., Lee N., Daims H. (2002) Microbial community composition and function in waste water treatment plants. *A. Van Leuww.* **81**:65–680.

Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:5261–67.

Watabe J., Ogata M. (1979) Studies on classification of *Acholeplasma*s isolated from horses, cattle and abattoir sewage. *Nihon. Juigaku Zasshi* **41**:9–17.

Wessén E., Hallin S., Philippot L. (2010) Differential responses of bacterial and

archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biol. Biochem.* **42**:1759–1765.

Whitman W., Coleman D., Wiebe W. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:6578–83.

Wittenberg J.B., Wittenberg B.A., Day D.A., Udvardi M.K., Appleby C.A. (1996) Siderophore bound iron in the peribacteroid space of soybean root nodules. *Plant Soil* **178**:161–169.

Wüst P.K., Horn M.A., Drake H.L. (2011) *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae* as active fermenters in earthworm gut content. *ISME. J.* **5**:92–106.

Xu D., Raza W., Yu G., Zhao Q., Shen Q., Huang Q. (2012) Phytotoxicity analysis of extracts from compost and their ability to inhibit soil-borne pathogenic fungi and reduce root-knot nematodes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**:1193–1201.

Yan N., Marschner P. (2012) Response of microbial activity and biomass to increasing salinity depends on the final salinity, not the original salinity. *Soil Biol. Biochem.* **53**:50–55.

Yasir M., Aslam Z., Kim S.W., Lee S.W., Jeon C.O., Chung Y.R. (2009) Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity. *Bioresource Technol.* **100**:4396–403.

Yuan B.C. Li Z.Z., Liu H., Gao M., Zhang Y.Y. (2007) Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. *Appl. Soil Ecol.* **35**:319–328.

Zhou J., Xia B., Treves D.S., Wu L.Y., Marsh T.L., O'Neill R.V., Palumbo A.V., Tiedje J.M. (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:326–334.

Changes in the Bacterial Community Structure in Stored Wormbed Leachate

Elda M. Romero-Tepal^a Eduardo Contreras-Blancas^b Yendi E. Navarro-Noya^a
Víctor M. Ruíz-Valdiviezo^a Marco Luna-Guido^a Federico A. Gutiérrez-Miceli^b
Luc Dendooven^a

^aLaboratory of Soil Ecology, ABACUS, Cinvestav, Mexico D.F. and ^bDepartment of Plant Biotechnology, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

Key Words

16S rRNA gene · Earthworms · Vermicompost leachate · Weighted UniFrac · Unweighted UniFrac · *Acholeplasma*

Abstract

Organic wastes, such as cow manure, are often composted with earthworms (vermicomposting) while excess water is drained and collected. This wormbed leachate is nutrient-rich and it has been extensively used to fertilize plants. However, it is derived partially from a not yet finished compost process and could exhibit phytotoxicity or contain potentially hazardous microorganisms. The bacterial community in wormbed leachate derived from vermicomposting of cow manure was studied by pyrosequencing the 16S rRNA gene. The fresh wormbed leachate was rich in Mollicutes, particularly the genus *Acholeplasma* which contain phytopathogen species. The abundance of the Mollicutes decreased when the leachate was stored, while that of the Rhizobiales and the genus *Pseudomonas* increased. The bacterial communities changed rapidly in the leachate during storage. The changes in ammonium, nitrate and inorganic carbon content of the wormbed leachate when stored were correlated to changes in the bacterial community structure. It was found that storage of the wormbed leachate might be required before it can be applied to crops as large proportions of potentially plant pathogens were found in the fresh leachate.

© 2014 S. Karger AG, Basel

Introduction

Organic wastes are often composted with earthworms or vermicomposted before being applied to soil. Earthworms directly affect microbial community structure by passing the microorganisms through the gut where they get in contact with the gut mucus, and releasing them via casting [Aira and Domínguez, 2011]. The resulting product is rich in nutrients, especially inorganic nitrogen and phosphorous [Aira et al., 2011; Arthur et al., 2012; Le Bayon and Binet, 2006]. In vermicomposting, beds fitted with a drainage and collection system are filled with organic waste, earthworms and bedding material. During vermicomposting, water is applied to guarantee optimum earthworm activity. The water is allowed to seep from the reservoirs to maintain optimum water content and to avoid anaerobic conditions [Yadav and Garg, 2011]. The collected leachate, often called ‘wormbed leachate’, contains microorganisms and the soluble nutrients of the vermicompost. Wormbed leachate is used often for its beneficial effect on crops [Fritz et al., 2012]. It has been reported that the wormbed leachate can contain plant growth factors and the nutrients can be used directly by plants and the micro-

E.M. Romero-Tepal, E. Contreras-Blancas and Y.E. Navarro-Noya contributed equally to the manuscript.

Table 1. Some characteristics of the wormbed leachate obtained from cow manure vermicompost and stored for 28 days

Days	EC, mS/cm	pH	Total nitrogen, mg/l	Organic carbon, mg/l	Inorganic carbon, mg/l	Concentration of		
						NO ₂ ⁻ , mg/l	NO ₃ ⁻ , mg/l	NH ₄ ⁺ , mg/l
0	11.4 a ^a	9.6 a	154 a	1,160 a	611 a	0.53 a	2.41 a	1.15 a
14	9.6 b	8.7 c	132 a	1,118 a	686 b	0.51 a	3.44 bc	0.95 b
28	11.6 a	8.9 b	81 a	1,085 a	759 c	0.44 a	3.85 c	0.51 c
MSD ^b	1.2	0.1	78	515	53	0.29	0.85	0.17

^a Values with the same letter are not significantly different over time (i.e. within the column). ^b Minimum significant difference ($p < 0.05$).

bial community in the rhizosphere [Atiyeh et al., 2002; Bess 2000; Gutiérrez-Miceli et al., 2011]. A widely described benefit of the wormbed leachate is their pathogen-suppressing effect when applied to the soil or used as foliar sprays [Scheuerell and Mahaffee, 2002]. Wormbed leachates could be viewed as potential alternatives to synthetic chemicals, such as fungicides or fertilizers, as they are safer for the environment and human health [Siddiqui et al., 2009]. However, beneficial effects of the wormbed leachate on plant development have not always been demonstrated [Koné et al., 2010]. It has also been reported that pathogens and phytotoxic compounds can be present in this leachate. Vermicompost leachate must be used with care, as seed bioassays demonstrated that vermicompost leachate inhibits seed germination and plant growth [Carballo et al., 2009; Xu et al., 2012]. Besides, pathogen or potentially pathogens might be hazardous for humans when applied to soil [Ingram and Millner, 2007]. In this respect, the beneficial and/or phytotoxic effects are reported to depend on the vermicompost substrates and the preparation process [Scheuerell and Mahaffee, 2002]. Aeration, storage of vermicompost teas and amendments of additives is reported to enhance the growth of beneficial and pathogen-suppressive microorganisms [Ingham and Rollins, 2006].

However, to the best of our knowledge, there are no studies characterizing the bacterial community composition of the leachates. The rapidly changing physicochemical conditions during the preparation of this leachate are likely to select for a succession of different microbial communities. It is evident that available substrates are the key factors in the selection of bacterial communities and that these bacterial communities be responsible of the beneficial or phytotoxic effects of the leachates.

In this study, the bacterial community composition was characterized in the wormbed leachate with high throughput technology, i.e. pyrosequencing of partial 16S rRNA genes, and the changes that occurred during its

storage were determined. The relative abundance of the taxonomic groups at different levels was correlated with the physicochemical properties.

Results

The physicochemical characterization of the leachate samples revealed that some properties remain stable with storage as total nitrogen (N), total carbon (C) and nitrite (NO₂⁻), while inorganic C, nitrate (NO₃⁻) and ammonium (NH₄⁺) increase with storage, and pH and electrolytic conductivity (EC) remains variable (table 1).

Pyrosequencing results of 16S rRNA gene were used to determine the bacterial community composition in the vermicomposting leachate samples after 0, 14 and 28 days of storage. The nine libraries yielded 15,779 sequences with an average length of 428 bp (table 2). A total of 1,958 operational taxonomic units (OTUs) (3% cut-off) were found. Richness estimator Chao1 increased over time while the Shannon and Simpson diversity indices were larger generally at day 14 than at days 0 and 28 (table 2).

The sequences were classified in 21 known phyla and the most important were Proteobacteria (51.5%, mean of days 0, 14 and 28), Actinobacteria (15.5%), Tenericutes (11.4%), Bacteroidetes (4.9%), Chloroflexi (1.9%), Firmicutes (1.8%) and Planctomycetes (1.2%) (fig. 1). The abundance of the other phyla was <1% while 7.9% bacterial sequences remained unclassified. The Proteobacteria phylum was represented by five classes, i.e. Alphaproteobacteria (32.2% mean of days 0, 14 and 28), Betaproteobacteria (9.1%), Gammaproteobacteria (8.9%), Deltaproteobacteria (0.2%) and Epsilonproteobacteria (0.2%).

The bacterial population in fresh leachate, i.e. at day 0, was dominated by Mollicutes (Tenericutes), such as the genus *Acholeplasma* (fig. 2, 3). After 14 days, the abundance of the Mollicutes and Actinomycetales decreased

Table 2. Summary of pyrosequencing data and α diversity indexes

Day	Sample	Barcode sequence	Number of reads ^a	Total number of OTUs ^b	Number of OTUs at 356 reads	Index		
						Chao1	Shannon	Simpson
0	1	TACGAGTATG	ND ^c	ND	ND	ND	ND	ND
	2	TACTCTCGTG	429	112	112	236	5.3	0.932
	3	TAGAGACGAG	797	228	151	350	6.2	0.964
14	1	TCGTCGCTCG	2,794	476	171	444	6.7	0.982
	2	ACATACGCGT	3,015	461	176	413	6.8	0.986
	3	ACGCGAGTAT	1,743	473	178	464	6.8	0.985
28	1	ACTACTATGT	3,175	511	169	513	6.4	0.974
	2	ACTGTACAGT	1,005	331	173	551	6.7	0.978
	3	AGACTATACT	2,758	480	171	444	6.5	0.979

^a Reads at high quality, i.e. >200 bp in length, >25% quality threshold and containing any unresolved nucleotides (total reads = 15,779). ^b Operational taxonomic units as determined by Uclust [Edgar, 2010] at a similarity threshold of 97%. ^c Not determined.

while the Rhizobiales became the dominant group of bacteria in the leachate stored for 14 days (fig. 2). After 28 days, the abundance of the Rhizobiales remained high, but phylotypes belonging to the Pseudomonadales became dominant. Consequently, the bacterial communities in the leachate after 0 and 14 days were separated clearly using both unweighted UniFrac (no data shown) and weighted UniFrac (fig. 4). After 28 days, the bacterial community structure changed again. Mantel tests for correlation analysis shows that the content in the leachates of NH_4^+ , NO_3^- and inorganic carbon, and pH were significantly correlated with the bacterial community structure considering weighted and unweighted data (table 3).

Discussion

Community Composition at High Taxonomic Rank in the Wormbed Leachates

In this study, the composition and structure of the bacterial communities in wormbed leachate were determined and compared at different times of storage. It is expected that the bacterial diversity of the fresh leachate (at day 0) resembled the bacterial community of the vermicompost itself. Some studies reported that uncultured bacteria belonging to the Acidobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Gammaproteobacteria and Gemmatimonadetes dominated the bacterial community in vermicompost based on the 16S rRNA gene analysis [Fracchia et al., 2006; Yasir et al., 2009]. As such, the Proteobacteria were found to be the dominant phylum in the vermicompost as was found in the wormbed

leachate. Bacteria in the fresh leachate included Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Alpha-, Beta-, Gamma- and Deltaproteobacteria, Tenericutes and Verrucomicrobia, taxa also common to soils [Navarro-Noya et al., 2013a; Nemergut et al., 2011; Wessén et al., 2010]. Also, Alpha-, Beta- and Gammaproteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Firmicutes are commonly dominant taxa in the earthworm gut [Bernard et al., 2012; Singleton et al., 2003; Wüst et al., 2011].

Potentially Phytopathogens in the Wormbed Leachate

It is well known that the organic material used in vermicomposting affects different aspects of the composting process. For instance, the transformation processes, maturity rates, biological beneficial effects, toxic compounds persistence and vermicompost quality are affected by the organic material used for vermicomposting [Benito et al., 2003; Campitelli and Ceppi, 2008; Zmora-Nahum et al., 2007]. Consequently, it can be assumed that the organic material used for vermicomposting will also determine the bacterial community structure of the wormbed leachate [Campitelli and Ceppi, 2008; Zmora-Nahum et al., 2007]. The large percentages of Tenericutes (class Mollicutes) detected in the wormbed leachate could come from the cow manure. Particularly, the genus *Acholeplasma* (class Mollicutes) were found in large percentages. *Acholeplasma*, *Spiroplasma* and mycoplasmas were detected in composts and vermicomposts prepared with dairy manure [Sasaki et al., 2009], chicken manure [Tiquia et al., 2005], and sewage horses, cattle and abattoir [Watabe and Ogata, 1979], and in poultry [Marois et

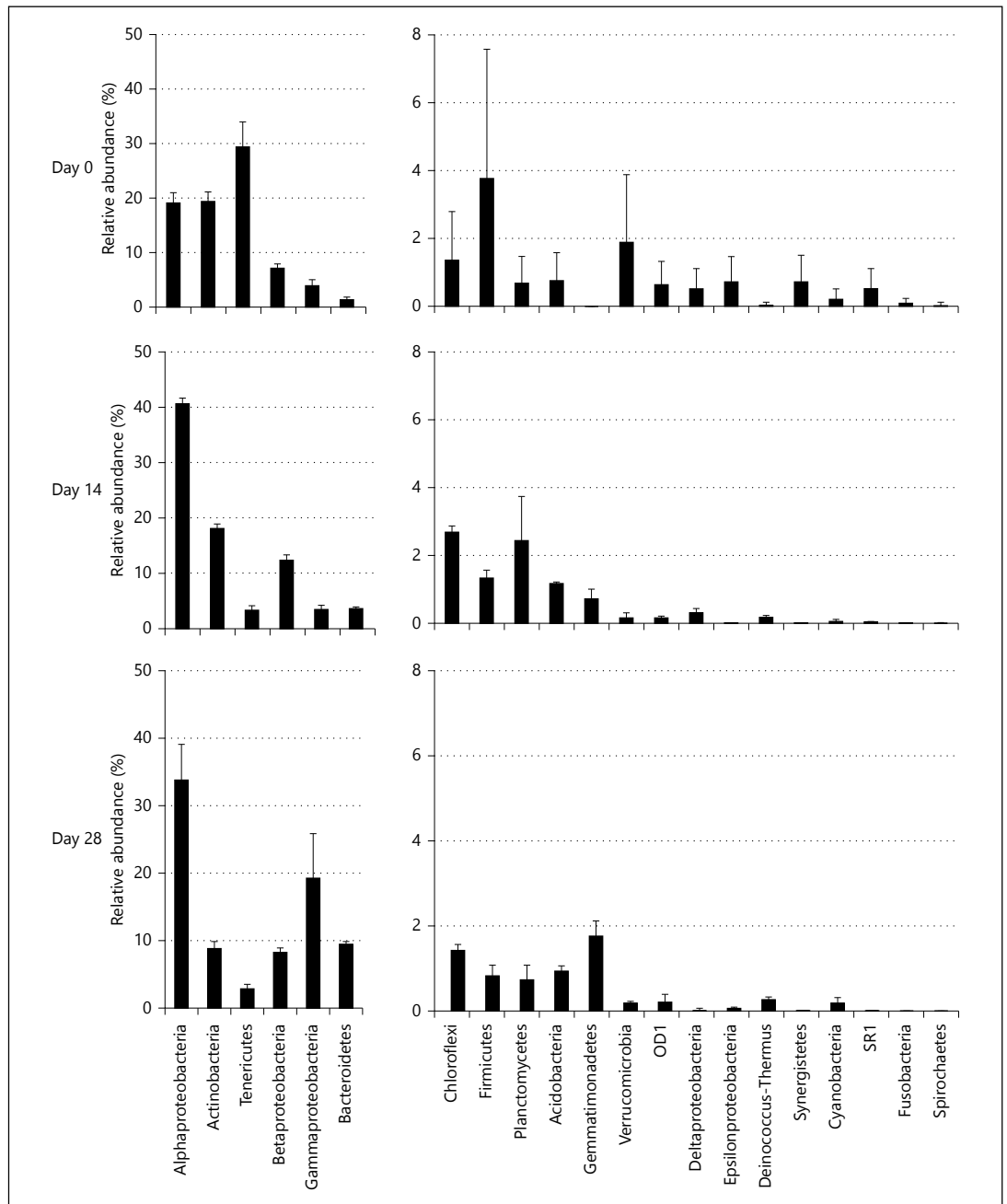


Fig. 1. Relative abundance of the different phyla as revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing analysis in the wormbed leachate stored for 0, 14 and 28 days.

al., 2002]. *Acholeplasma* is a widely distributed mycoplasma in nature and possesses very versatile adaptation capabilities [Chernov et al., 2005]. Among all its ecological capabilities, it is a causative agent of some plant diseases [Chernov et al., 2007, 2011]. The successful virulence traits (infectivity, invasivity, toxigenicity and per-

sistence) of *Acholeplasma* towards plants suggest that it can survive unfavorable conditions, such as oxidative stress, limited substrate and temperature fluctuations [Chernov et al., 2011]. It has been proposed that phytotoxicity is one of the most important criteria for evaluating the suitability of leachate for plant applications

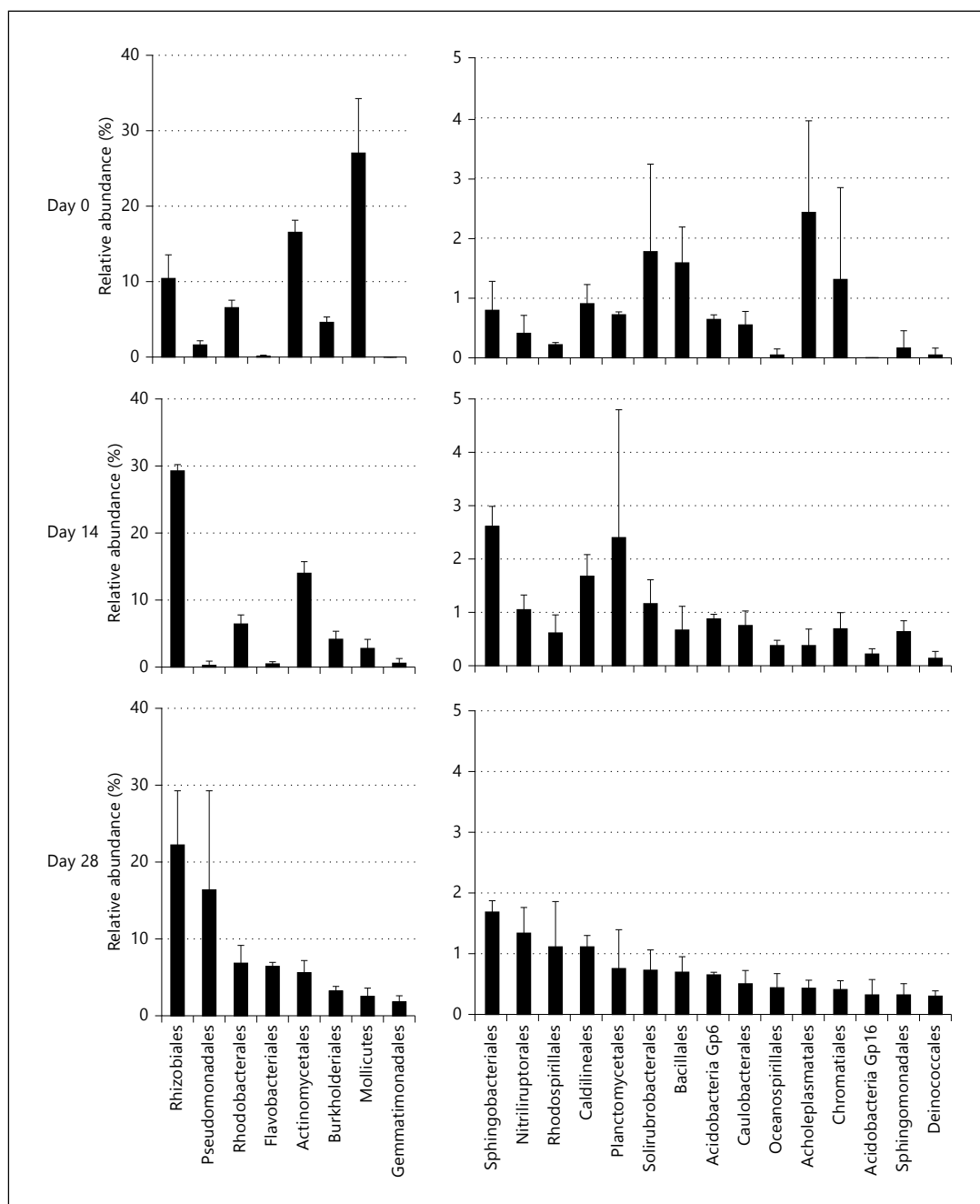


Fig. 2. Relative abundance of the different orders as revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing analysis in the wormbed leachate stored for 0, 14 and 28 days.

[Carballo et al., 2009; Tang et al., 2006; Xu et al., 2012]. However, application of wormbed leachate to soil might spread phytopathogens. The target pathosystem (pathogen and host plant) may not be complete in soils or plants where leachate is applied. However, insects are considered to be mycoplasma vectors toward plants [Lee et al.,

2000]. Additionally, *Achleplasma* can invade plants through the intact root system [Chernov et al., 1996]. In controlling phytoplasmal diseases, the primary concern is prevention rather than treatment. Phytoplasma-associated diseases have been managed by planting disease-free stocks or disease-resistant varieties, through control

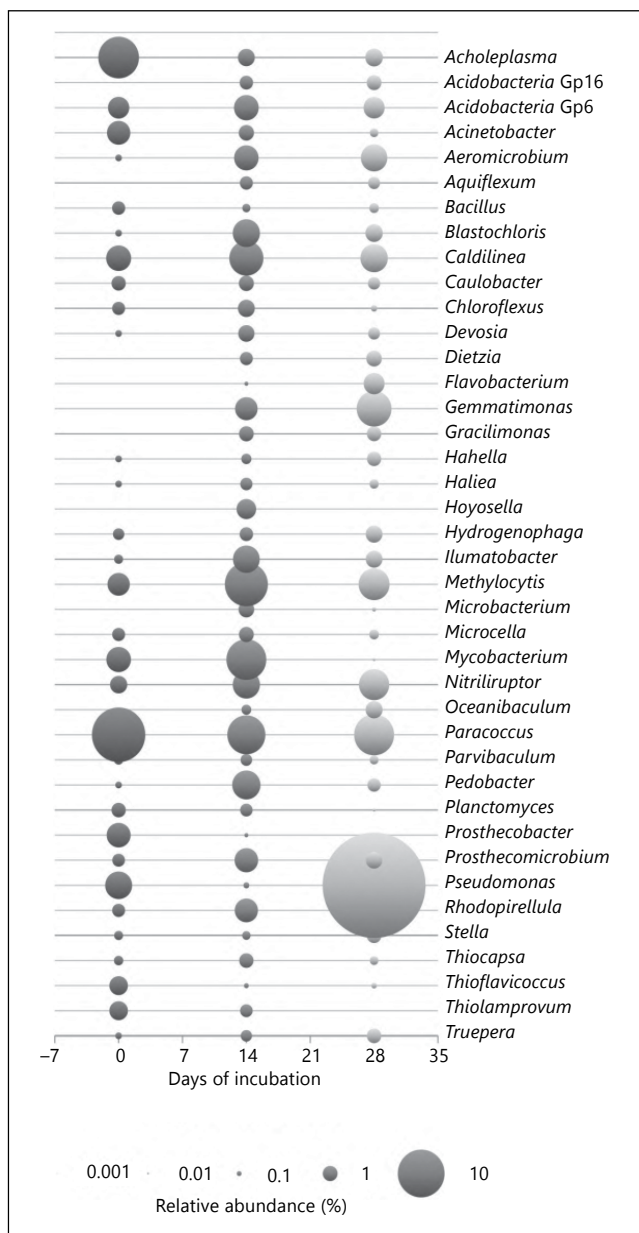


Fig. 3. Bubble plot of the most abundant genera as revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing analysis (>1% in at least one of the leachate samples) detected in the wormbed leachate stored for 0, 14 and 28 days. The size of the bubble indicates the relative abundance of each genus. Relative abundance of Rhodopirellula at day 28 was 1.4%.

of insect vectors, and by applying certain cultural practices to eliminate the sources of phytoplasmas [Lee et al., 2000]. Thus, applying wormbed leachates containing phytoplasmas to the soil could be of serious concern. After 28 days of storage, the wormbed leachate contains significantly lower relative abundance of Mollicutes and

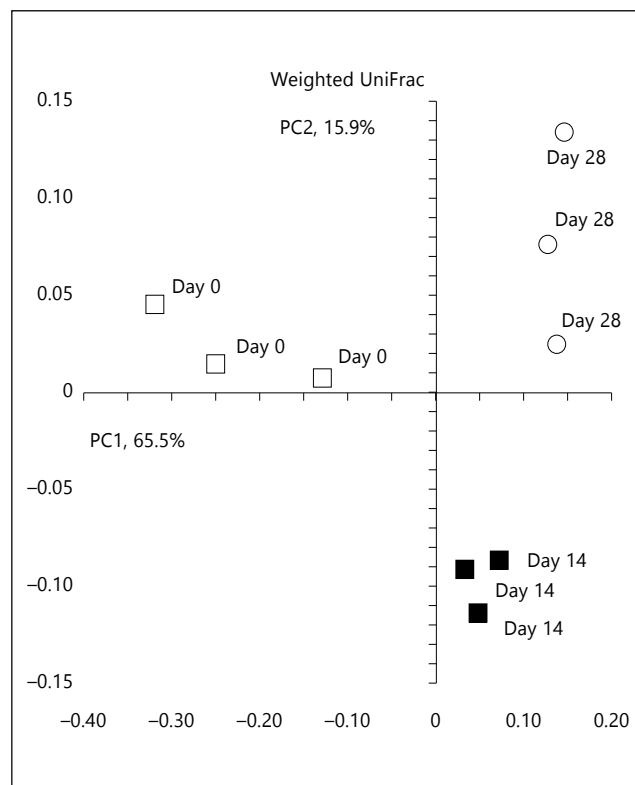


Fig. 4. UniFrac weighted analysis of the bacterial communities in the stored wormbed leachate after 0, 14 and 28 days.

Table 3. Mantel tests for correlation analysis (*R* values) between the physicochemical characteristics and bacterial community structures

Physicochemical characteristic	UniFrac distance with unweighted data		UniFrac distance with weighted data	
	<i>R</i> value	p value	<i>R</i> value	p value
Inorganic carbon	0.687	0.001	0.679	0.002
pH	0.811	0.009	0.808	0.022
NH ₄ ⁺	0.494	0.031	0.513	0.033
NO ₃ ⁻	0.564	0.008	0.447	0.035

Highly significant values in bold.

Acholeplasma. It appears that storage of the leachates before application is needed to reduce the levels of potentially pathogen microorganisms. However, here we are reporting relative abundance. Absolute quantifications would be required to know the number of these microorganisms contained in the leachates. Other genera

found in the wormbed leachate that contain also known pathogens were *Mycobacterium*, *Paracoccus* and *Pseudomonas* (online suppl. table S1).

Rapid Changes in the Bacterial Communities in the Storage of the Wormbed Leachate

At different stages of maturation of the vermicompost, the bacterial communities changed [Sen and Chandra, 2009]. However, bacterial communities in the composting process, apparently, are more stable [Vaz-Moreira et al., 2008] compared with what occurs with the bacterial communities in the leachate. Although the bacterial diversity remains similar over time, the bacterial community structure changed profoundly, as reflected the Uni-Frac analysis. These changes over time were explained by the changes in the physicochemical characteristics of the leachate. The rapidly changing physicochemical conditions during storage of the leachate are likely to drive the succession of the bacterial communities. The bacterial composition based on phylogenetic information demonstrates that chemical properties as ammonium, nitrate and inorganic carbon content were significantly correlated with bacterial composition. It is evident that changes in the available substrates in the wormbed leachate are the key drivers of the bacterial populations, thus changing the bacterial community structure.

It is too speculative to directly deduce functional properties from the ribosomal sequences detected in this study as many of them could not been metabolically active [Chen and Murrell, 2010]. However, some bacterial genera could be associated with the antifungal or plant growth promotion activities that occasionally characterized the leachates. Some of these groups were larger in their relative abundance with time. The most important group was Pseudomonadales (*Pseudomonas*), which harbors species that can inhibit pathogen growth, e.g. sugar beet root rot caused by *Sclerotium rolfsii* [Thilagavathi et al., 2012]. *Pseudomonas fluorescens* strain Pf1 in combination with either *Trichoderma asperellum* strain TTH1 or *Bacillus subtilis* strain EPCO-16 reduced the disease. On the other hand, *Pseudomonas syringae* is the etiologic agent of serious diseases in a wide range of important crop plants [O'Brien et al., 2011]. The second most important group was bacteria that belonged to the Actinomycetales (Actinobacteria). Actinomycetales is an order belonging to the Actinobacteria and they are very diverse. The genera identified in the wormbed leachate, i.e. *Aeromicrobium*, *Mycobacterium* and *Dietzia* have the capacity to degrade cellulose (online suppl. table S1). A third important group identified in the wormbed leachate was the order Rhizobiales (Alphaproteobacteria).

The order of the Rhizobiales harbors many microorganisms considered plant growth-promoting rhizobacteria. Many genera belonging to the Rhizobiales are known nitrogen fixers and also described as producers of siderophores, indoleacetic acid, phosphorous solubilizers [Abd-Alla, 1994; Antoun et al., 2004; Wittenberg et al., 1996], and are frequently used as plant growth-promoting rhizobacteria [Khan, 2005]. Although the abundance of the Bacillales was low, they might still be important to control pathogens. Antifungal compounds, such as surfactin, are produced by *B. subtilis* [Dunlap et al., 2013] and iturin A is produced by *Bacillus amyloliquefaciens* [Mochizuki et al., 2012]. Vaz-Moreira et al. [2008] reported that strains of the genus *Bacillus* were the most abundant in a vermicompost produced from kitchen refuse.

In conclusion, this is the first comprehensive study describing the bacterial community structure by pyrosequencing of the 16S rRNA genes in wormbed leachate obtained during vermicomposting of cow manure. Here we described how the composition of the bacterial communities could explain the highly variable beneficial or phytotoxic effect of the leachates. Bacterial communities changed rapidly in these substrates during storage. The abundance of the Mollicutes decreased when the leachate was stored. The changes in ammonium, nitrate and inorganic carbon content of the wormbed leachate when stored were correlated to changes in the bacterial community structure.

Experimental Procedures

Sample Preparation of Wormbed Leachate

Vermicompost was produced by adding earthworms (*Eisenia foetida* L.) to cow manure (25 g/kg). Three beds (1.5 m × 6.6 m × 1 m deep) were filled and the mixture was being turned over mechanically every 15 days for 2 months. Further details of the vermicomposting process and the amount of earthworms added can be found in Gutiérrez-Miceli et al. [2011]. The leachate from each bed was collected in 200-liter storage tanks. A 1-liter aliquot was taken from three storage tanks. As such, three different wormbed leachates were obtained and stored separately for 28 days.

Incubation of the Wormbed Leachate

The leachates were kept in the greenhouse for 28 days. Storage tanks were loosely covered and maintained in the dark. The temperature in the greenhouse ranged from 11 to 28°C. The leachates were stirred every seven days. After 0, 14 and 28 days, a 50-ml subsample was taken in triplicate from each sample (n = 3) and characterized chemically and for DNA extraction. As such, a total of nine samples was analyzed chemically and extracted for DNA (n = 9), i.e. three samples from each of the three storage tanks. The wormbed leachate was characterized for EC, pH, total C and N, inorganic C and concentrations of NH₄⁺, NO₂⁻ and NO₃⁻ as described by Gutiérrez-Miceli et al. [2011].

DNA Extraction, 16S rRNA Gene Amplification and Pyrosequencing Processing

After 0, 14 and 28 days, the metagenomic DNA was extracted from the nine samples. Metagenomic DNA was isolated according to a procedure reported previously [Navarro-Noya et al., 2013b]. The metagenomic DNA concentration was quantified on a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Suwanee, Ga., USA). The three samples were stored at -20°C until used for PCR amplification. The primers 8-F (5'-AGA GTT TGA TCI TGG CTC A-3') and 556-R (5'-TGC CAG IAG CIG CGG TAA-3') containing 10 pb multiplex identifiers (MID) and the Roche 454 pyrosequencing adaptors Lib-L, were used to amplify the region V1-V3 of the 16S rRNA gene from the metagenomic DNA [Navarro-Noya et al., 2013a]. The PCR mixture (25 µl) contained 1x reaction buffer, 10 mM of each of the four deoxynucleoside triphosphates, 10 pM of each primer, 0.7 U Phusion Hot Start High Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) and 20 ng metagenomic DNA as template. The following thermal cycling protocol was used: initial denaturation at 94°C for 10 min, 25 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 53°C for 45 s, and extension at 72°C for 45 s followed by a final extension period at 72°C for 10 min. All samples were amplified in triplicate, pooled in equal amounts, and purified using the DNA clean and concentrator purification kit as recommended by the manufacturer (Zymo Research, Irvine, Calif., USA). Quantification of the PCR products was done using the PicoGreen® reagent (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) in a NanoDrop™ 3300 Fluorospectrophotometer. Sequencing was done using a Roche GS-FLX Titanium 454 pyrosequencer (Roche, Mannheim, Germany) by Macrogen, Inc. (DNA Sequencing Service, Seoul, Korea).

Statistical Analysis and Analysis of the Sequences

Sequences were processed through the QIIME pyrosequencing pipeline (<http://www.qiime.org/>). Sequences of low quality were removed of the data sets i.e. read length shorter than 200 bp, with quality score <25, containing homopolymers of more than 6 bases.

References

- Abd-Alla MH: Solubilization of rock phosphates by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Folia Microbiol* 1994;39:53-56.
- Aira M, Domínguez J: Earthworm effects without earthworms: inoculation of raw organic matter with worm-worked substrates alters microbial community functioning. *PLoS One* 2011;6:e16354.
- Aira M, Gómez-Brandón M, González-Porto P, Domínguez J: Selective reduction of the pathogenic load of cow manure in an industrial-scale continuous-feeding vermireactor. *Bioresource Technol* 2011;20:9633-9637.
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Llande R: Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth-promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes. *Plant Soil* 2004;204:57-67.
- Arthur GD, Aremu AO, Kulkarni MG, Van Staden J: Vermicompost leachate alleviates deficiency of phosphorus and potassium in tomato seedlings. *HortScience* 2012;47:1304-1307.
- Atiyeh RM, Lee S, Edwards CA, Arancon NQ, Metzger JD: The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technol* 2002;84:7-14.
- Benito M, Masaguer A, Moliner A, Arrigo N, Palma RM: Chemical and microbiological parameters for the characterisation of the stability and maturity of pruning waste compost. *Biol Fert Soil* 2003;37:184-189.
- Bernard L, Chapuis-Lardy L, Razafindrakoto M, Pablo AL, Legname E, Poulain J, Brúls T, O'Donohue M, Brauman A, Chotte JL, Blanchart E: Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. *ISME J* 2012;6:213-222.
- Bess VH: Understanding compost tea. *Biocycle* 2000;10:71.
- Campitelli P, Ceppi S: Chemical, physical and biological compost and vermicompost characterization: A chemometric study. *Chemometr Intell Lab* 2008;90:64-71.
- Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R: PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 2010;26:266-267.
- Carballo T, Gil MV, Calvo LF, Morán A: The influence of aeration system, temperature and compost origin on the phytotoxicity of compost tea. *Compost Sci Util* 2009;17:127-139.
- Chao A, Bunge J: Estimating the number of species in a stochastic abundance model. *Biometrics* 2002;58:531-539.
- Chen Y, Murrell JC: When metagenomics meets stable-isotope probing: progress and perspectives. *Trends Microbiol* 2010;8:157-163.

- Chernov VM, Chernova OA, Medvedeva ES, Mouzykantov AA, Ponomareva AA, Shaymardanova GF, Gorshkov OV, Trushin MV: Unadapted and adapted to starvation *Acholeplasma laidlawii* cells induce different responses of *Oryza sativa*, as determined by proteome analysis. *J Proteomics* 2011;74:2920–2936.
- Chernov VM, Gogolev YV, Popova NV, Chernova OA: Infections of *Pisum sativum* of *Acholeplasma laidlawii* PG8 lead to change of morphological and physiological features of plants. *Dokl Acad Sci* 1996;348:428–430.
- Chernov VM, Mukhametshina NE, Gogolev YV, Abdrakhimov FA, Chernova OA: Adaptive reactions of mycoplasmas in vitro: 'Viable but unculturable forms' and nanocells of *Acholeplasma laidlawii*. *Microbiology* 2005;74:428–433.
- Chernov VM, Moukhametshina NE, Gogolev YV, Nesterova TN, Trushin MV, Chernova OA: *Acholeplasma laidlawii* PG8 culture adapted to unfavorable growth conditions shows an expressed phytopathogenicity. *Sci World J* 2007;7:1–6.
- Dunlap CA, Bowman MJ, Schisler DA: Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: a biocontrol antagonist of *Fusarium* head blight. *Biol Control* 2013;64:166–175.
- Edgar RC: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010;26:2460–2461.
- Fracchia L, Dohrmann AB, Martinotti MG, Tebbe CC: Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Microbiol Biot* 2006;71:942–952.
- Fritz JJ, Franke-Whittle IH, Haindl S, Insam H, Braun R: Microbiological community analysis of vermicompost tea and its influence on the growth of vegetables and cereals. *Can J Microbiol* 2012;58:836–847.
- Gutiérrez-Miceli FA, Oliva-Llaven MA, Mendoza-Nazar P, Ruiz-Sesma B, Alvarez-Solis JD, Dendooven L: Optimization of vermicompost and wormbed leachate for the organic cultivation of radish. *J Plant Nutr* 2011;34:1642–1653.
- Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G, Ciulla D, Tabbaa D, Highlander SK, Sodergren E, Methé B, DeSantis TZ: Human Microbiome Consortium, Petrosino JF, Knight R, Birren BW: Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* 2011;21:494–504.
- Ingham ER, Rollins CA: Actively aerated compost teas; in *Adding Biology – For Soil and Hydroponic Systems*. Nature Technologies, LLC, Sonoma, 2006.
- Ingram DT, Millner PD: Factors affecting compost tea as a potential source of *Escherichia coli* and *Salmonella* on fresh produce. *J Food Protect* 2007;70:828–834.
- Khan AG: Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol* 2005;8:355–364.
- Koné SB, Dionne A, Tweddell RJ, Antoun H, Avis TJ: Suppressing effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. *Biol Control* 2010;52:167–173.
- Le Bayon RC, Binet F: Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. *Soil Biol Biochem* 2006;38:235–246.
- Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE: Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:221–255.
- Lozupone C, Knight R: UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:8228–8235.
- Marois C, Savoye C, Kobisch M, Kempf I: A reverse transcription-PCR assay to detect viable *Mycoplasma synoviae* in poultry environmental samples. *Vet Microbiol* 2002;89:17–28.
- Mochizuki M, Yamamoto S, Aoki Y, Suzuki S: Isolation and characterisation of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biocontrol Sci Technol* 2012;22:697–709.
- Navarro-Noya YE, Gómez-Acata S, Montoya-Ciriaco N, Rojas-Valdes A, Suárez-Arriaga M, Valenzuela-Encinas C, Jiménez-Bueno N, Verhulst N, Govaerts B, Dendooven L: Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biol Biochem* 2013a;65:86–95.
- Navarro-Noya YE, Suárez-Arriaga MC, Rojas-Valdes AM, Montoya-Ciriaco N, Gómez-Acata S, Fernández-Luqueño F, Dendooven L: Pyrosequencing analysis of the bacterial community in drinking water Wells. *Microb Ecol* 2013b;66:19–29.
- Nemergut DR, Costello EK, Hamady M, Lozupone C, Jiang L, Schmidt SK, Fierer N, Townsend AR, Cleveland CC, Stanish L, Knight R: Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ Microbiol* 2011;13:135–144.
- O'Brien HE, Thakur S, Guttman DS: Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective. *Annu Rev Phytopathol* 2011;49:269–289.
- Sasaki H, Nonaka J, Otawa K, Kitazume O, Asano R, Sasaki T, Nakai Y: Analysis of the structure of the bacterial community in the Livestock manure-based composting process. *Asian Aust. J Anim Sci* 2009;22:113–118.
- Scheuerell SJ, Mahaffee WF: Compost tea: principles and prospects for plant disease control. *Comp Sci Util* 2002;10:313–338.
- Sen B, Chandra TS: Do earthworms affect dynamics of functional response and genetic structure of microbial community in a lab-scale composting system? *Bioresource Technol* 2009;100:804–811.
- Shannon CE, Weaver W: The mathematical theory of information. *AT&T Tech J* 1949;27:359–423.
- Siddiqui Y, Meon S, Ismail R, Rahmani M: Biopotential of compost tea from agro-waste to suppress *Choanephora cucurbitarum* L. the causal pathogen of wet rot of okra. *Biol Control* 2009;49:38–44.
- Singleton DR, Hendrix PF, Coleman DC, Whitman WB: Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (*Lumbricidae*; *Oligochaeta*). *Soil Biol Biochem* 2003;35:1547–1555.
- Tang JC, Maie N, Tada Y, Katayama A: Characterization of the maturing process of cattle manure compost. *Process Biochem* 2006;41:380–389.
- Thilagavathi R, Rajendran L, Nakkeeran S, Ragu-chander T, Balakrishnan A, Samiyappan R: Vermicompost-based bioformulation for the management of sugar beet root rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Arch Phytopathol Plant Protect* 2012;45:2243–2250.
- Tiquia SM, Ichida JM, Keener HM, Elwell DL, Burt EH Jr, Michel FC Jr: Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;67:412–419.
- Vaz-Moreira I, Silva ME, Manaia CM, Nunes OC: Diversity of bacterial isolates from commercial and homemade composts. *Microb Ecol* 2008;55:714–722.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR: Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5261–5267.
- Watabe J, Ogata M: Studies on classification of *Acholeplasmas* isolated from humans, cattle and abattoir sewage. *Nihon Juigaku Zasshi* 1979;41:9–17.
- Wessén E, Hallin S, Philippot L: Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biol Biochem* 2010;42:1759–1765.
- Wittenberg JB, Wittenberg BA, Day DA, Udvardi MK, Appleby CA: Siderophore bound iron in the peribacteroid space of soybean root nodules. *Plant Soil* 1996;178:161–169.
- Wüst PK, Horn MA, Drake HL: Clostridiaceae and Enterobacteriaceae as active fermenters in earthworm gut content. *ISME J* 2011;5:92–106.
- Xu D, Raza W, Yu G, Zhao Q, Shen Q, Huang Q: Phytotoxicity analysis of extracts from compost and their ability to inhibit soil-borne pathogenic fungi and reduce root-knot nematodes. *World J Microbiol Biotechnol* 2012;28:1193–1201.
- Yadav A, Garg VK: Industrial wastes and sludges management by vermicomposting. *Rev Environ Sci Bio Technol* 2011;10:243–276.
- Yasir M, Aslam Z, Kim SW, Lee SW, Jeon CO, Chung YR: Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity. *Bioresource Technol* 2009;100:4396–4403.
- Zmora-Nahum S, Hadar Y, Chen Y: Physico-chemical properties of commercial composts varying in their source materials and country of origin. *Soil Biol Biochem* 2007;39:1263–1276.