

ECOLOGÍA MICROBIANA

AIRE

Un bioaerosol es un conjunto de unidades biológicas suspendidas en el aire como microgotas o polvo, de 0,5 a 30 μm de diámetro, y el viento sirve de transporte para la dispersión. La composición y concentración de los microorganismos en los bioaerosoles varía con las fuentes. En aquéllos generados en el agua por lo común los organismos están rodeados de una capa fina de humedad y suelen consistir en agregados de varios microbios. Los provenientes del suelo son con frecuencia unidades aisladas o asociadas con partículas de polvo.

El transporte y asentamiento final de un bioaerosol depende de las propiedades físicas de las partículas y los parámetros ambientales que encuentra mientras está suspendido, como la magnitud de las corrientes de aire, la humedad relativa y la temperatura. Una humedad relativa baja y temperatura alta contribuyen a la afluencia de microbios en el aire, como algunas bacterias de la filósfera y esporas fúngicas, por ejemplo *Cladosporium*. Estos parámetros también influyen en la supervivencia de los microbios en el aire y afectan su capacidad para colonizar las superficies sobre las que se depositan. En general las esporas fúngicas, los virus entéricos y los quistes de protozoos son más resistentes al estrés ambiental que las bacterias y algas durante el transporte a través del aire, aunque los endosporos bacterianos no son afectados.

La inhalación, ingestión y contacto superficial son las vías de exposición de los animales a los organismos del aire. El ser humano en promedio inhala unos 10 m³ de aire por día. Las grandes partículas son retenidas en el tracto respiratorio superior (nariz y rinofaringe). Generalmente las partículas menores que 6 μm de diámetro son transportadas hasta los pulmones, pero los alveolos son retenidas las de 1 a 2 μm . El asma, la pneumonitis por hipersensibilidad y otras enfermedades respiratorias están asociadas con la exposición a los bioaerosoles, como los generados durante el proceso de compostaje (81).

Los patógenos vegetales que son dispersados pasivamente a través del viento a veces a grandes distancias, suelen producir enormes cantidades de propágulos. En cambio los mecanismos de descarga activa propulsan a las esporas al aire independientemente del viento y requieren una alta humedad, por lo que las mayores concentraciones se alcanzan durante la noche o las primeras horas de la mañana (81).

Cuadro 4.1. Concentración de microorganismos en el aire según diversas fuentes (81)

Actividad	Microorganismos	Concentración ufc/m ³
Crianza de animales	bacterias	10 ³ – 10 ⁵
	hongos	10 ³ 10 ⁶ – 10 ⁷
Cultivos	hongos	150 – 69.000
Cosecha y almacenamiento de granos	bacterias	50 – 6.500 240 – 19.000
	hongos	10 ³ – 10 ⁵ 10 ⁶ – 10 ⁹
Manufactura de algodón y tabaco	bacterias totales	10 – 7.500
	bacterias Gram-negativas	3.200 – 3.500
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	20 – 400
	hongos	10 ⁵ 600 – 10.600 esporas/m ³
Comunidades rurales	algas	100 – 800 unidades/m ³

Se pueden recolectar las esporas diseminadas por el aire, dejando que sedimenten naturalmente sobre portaobjetos o placas de medios de cultivo apropiados, pero se suelen recoger en aparatos, como por ejemplo el muestreador de Andersen que consta de un cilindro con placas metálicas perforadas y cajas de Petri intercaladas donde el aire entra por arriba y es succionado por debajo. El tamaño de las perforaciones se hace progresivamente más pequeño hacia la base y la velocidad del aire aumenta, por lo tanto las esporas grandes impactan contra la

caja superior y las más pequeñas chocan contra las cajas que se encuentran más abajo (93).

AGUA

La disponibilidad de agua con las garantías higiénicas necesarias depende principalmente de los sistemas de eliminación de residuos. La contaminación fecal, a través de las aguas residuales sin depurar o tratadas de forma inadecuada que entra en lagos, ríos o napas freáticas, crea condiciones para la diseminación rápida de los microbios patógenos.

Los organismos infecciosos, por ejemplo *Vibrio cholerae* (colera), *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), otras especies de *Salmonella* y *Shigella* (infecciones gastrointestinales de gravedad variable), *Entamoeba histolytica* (disentería amebiana) y otros protozoos, se liberan en las heces o el estiércol. La ruta primaria de infección es agua de bebida, pero los utensilios, frutas y verduras lavados con agua contaminada son otros portadores (46).

La detección de los enteropatógenos como *Salmonella* o *Shigella* es una tarea difícil e incierta para un control de rutina. En cambio es factible el análisis de los organismos marcadores de la presencia y el grado de la contaminación fecal.

Los requisitos que un organismo marcador deben cumplir son:

- estar presente siempre que los patógenos estén presentes,
- encontrarse en mayor cantidad que los patógenos para proporcionar un margen de seguridad,
- sobrevivir en el ambiente tanto tiempo como los posibles patógenos,
- ser fácil de detectar, con una alta confiabilidad en la identificación independientemente de otros organismos que se encuentran en la muestra.

La bacteria marcadora que se analiza con más frecuencia es *Escherichia coli* no patógeno pues cumple muchos de estos criterios. Las pruebas positivas no demuestran la presencia de enteropatógenos, pero sí la posibilidad de su presencia. Los enterococos también han sido usados como marcadores la calidad del agua debido a que son habitantes comunes del tracto intestinal. Los clostridios sulfito-reductores (*C. perfringens*, *C.*

welchii) están en las deyecciones de los animales de sangre caliente y se han considerado marcadores de contaminación fecal remota, pero son ubicuos en los sistemas acuáticos. *Pseudomonas aeruginosa* es útil para el análisis de aguas recreacionales que reciben desinfección química.

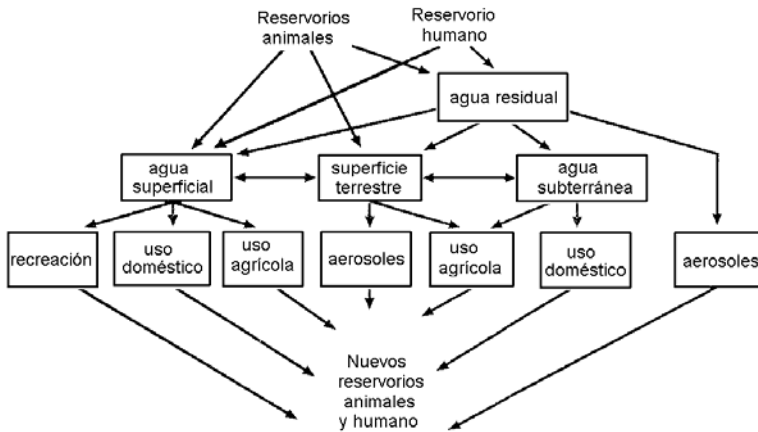


Figura 4.1. Rutas ambientales de los patógenos en relación con el agua (81)

Las bacterias fermentadoras de lactosa como *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* se denominan coliformes, pero solamente la primera es de origen exclusivamente fecal. Hay varias técnicas para la detección de coliformes en el agua, como la del número más probable y la filtración por membrana. Estos procedimientos tardan varios días en completarse, por lo que se tiende a determinar solamente la presencia o ausencia de bacterias coliformes fecales, debido a que el nivel de las mismas no está relacionado cuantitativamente con la posibilidad de un brote de alguna enfermedad transmitida por el agua y el ensayo proporciona suficiente información sobre la calidad del agua. Sin embargo, estos métodos no detectan bacterias viables pero no cultivables, ya que en situaciones oligotróficas una proporción de la población total puede ser irrecuperable en los cultivos corrientes (81).

En la prueba clásica para la detección de contaminación fecal se

inocula caldo-lactosa con la muestra de agua o una dilución de la misma. La formación de gas a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ es una prueba presuntiva de la contaminación por coliformes fecales, debido a que el crecimiento a esa temperatura es una característica de *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*, pero también de algunas cepas de *Klebsiella*, aunque no todas estas bacterias son fermentadoras de lactosa. En la prueba confirmatoria sobre agar Levine (EMB), las colonias oscuras de *E. coli* adquieren un brillo metálico característico y los que no fermentan la lactosa tienen colonias incoloras (35).

Número más probable de coliformes

Si el agua puede contener cloro residual, agregar en condiciones de asepsia 2 mL de una solución estéril de tiosulfato de sodio al 1% a cada litro de muestra.

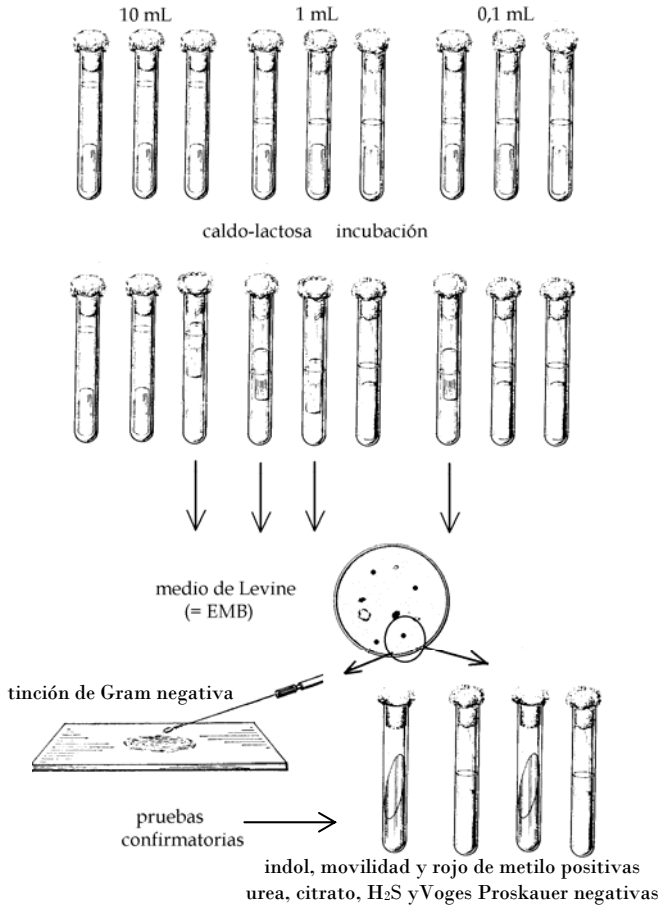
Sembrar tres tubos de caldo-lactosa doble concentración con 10 mL de muestra, tres tubos de medio simple con 1 mL y los tres restantes con 0,1 mL cada uno. Incubar a 35°C durante 24-48 hs. Para coliformes fecales usar el medio EC e incubar a $44 \pm 1^\circ\text{C}$. El caldo-lactosa simple contiene: extracto de carne 3 g, peptona 5 g, lactosa 5 g, púrpura de bromocresol (al 0,5%) 4 mL, agua 1 L, pH 7,2. Repartir en tubos con campanita. El medio doble concentración contiene los mismos ingredientes en 500 mL de agua.

El medio EC simple contiene: peptona 20 g, lactosa 5 g, sales biliares 1,5 g, fosfato dipotásico 4 g, fosfato monopotásico 1,5 g, cloruro de sodio 5 g, agua destilada 1 L. Para el medio doble concentración se disuelven los sólidos en 500 mL de agua. Se reparte en tubos con una campanita (94).

Observar los tubos que presentan gas en cada una de las series. Obtener el número característico donde la primera cifra corresponde a los tubos de positivos sembrados con 10 mL de muestra, la segunda a los positivos que recibieron 1 mL y la tercera a los positivos con 0,1 mL de agua. Consultar la tabla para obtener el número más probable de coliformes o coliformes fecales en 100 mL de la muestra.

Escherichia coli

Sembrar 1 asa de cada uno de los tubos positivos para coliformes fecales en sectores de las placas de agar Levine (EMB). Este medio contiene peptona 10 g, lactosa 5 g, sacarosa 5 g, fosfato dipotásico 2 g, agar 15 g, eosina 0,4 g, azul de metileno 0,065 g, agua 1 L, pH 7,2. Incubar a 35°C durante 48 horas. En este medio las colonias son negras con brillo metálico (35).



La tolerancia en las aguas de consumo suele ser de 100 bacterias aerobias banales y 2 coliformes totales en 100 mL de agua, pero deben estar ausentes los coliformes fecales.

Otra técnica es la filtración de volúmenes conocidos de muestra de agua diluída o sin diluir a través de membranas con rejilla hidrofóbica y poros de 0,45 μm seguida de la incubación del filtro, depositado directamente sobre el medio de cultivo gelificado o un disco de papel grueso impregnado con el medio líquido, para contar luego las colonias desarrolladas (35).

Número más probable por mL de muestra utilizando series de tres tubos inoculados con 10 mL, 1 mL y 0,1 mL (35)			
Número característico	Índice NMP	Número característico	Índice NMP
0 0 1	3	2 0 0	9
0 0 2	6	2 0 1	14
0 0 3	9	2 0 2	20
0 1 0	3	2 0 3	26
0 1 1	6,1	2 1 0	15
0 1 2	3,2	2 1 1	20
0 1 3	12	2 1 2	27
0 2 0	6,2	2 1 3	34
0 2 1	9,3	2 2 0	21
0 2 2	12	2 2 1	28
0 2 3	16	2 2 2	35
0 3 0	9,4	2 2 3	42
0 3 1	13	2 3 0	29
0 3 2	16	2 3 1	36
0 3 3	19	2 3 2	44
1 0 0	3,6	2 3 3	53
1 0 1	7,2	3 0 0	23
1 0 2	11	3 0 1	39
1 0 3	15	3 0 2	64
1 1 0	7,3	3 0 3	95
1 1 1	11	3 1 0	43
1 1 2	15	3 1 1	75
1 1 3	19	3 1 2	120
1 2 0	11	3 1 3	160
1 2 1	15	3 2 0	93
1 2 2	20	3 2 1	150
1 2 3	24	3 2 2	210
1 3 0	16	3 2 3	290
1 3 1	20	3 3 0	240
1 3 2	24	3 3 1	460
1 3 3	29	3 3 2	1100

Las pruebas basadas en la determinación de la presencia-ausencia son procedimientos alternativos que proporcionan la información necesaria en 24 horas o menos. Para detectar β -

galactosidasa que indica la presencia de bacterias coliformes, se emplea un medio que contiene isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), y para detectar β -glucuronidasa que es diagn3stica de *E. coli*, se utiliza un medio que contiene el compuesto fluorog3nico 4-metil-umbeliferil- β -D-glucur3nido (MUG) adem3s de o-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (81), pero solamente el 95% de las cepas de *E. coli* tienen la enzima glucuronidasa (95).

Identificaci3n de *Escherichia coli*

Tomar material de las colonias presuntivas de la placa de agar de Levine, hacer un coloraci3n de Gram y repicar en los medios de Simmons, Christensen, Clark & Lubs y SIM (por puncci3n en este 3ltimo). Incubar a 37°C durante 48 horas.

Si se trata de *E. coli* la coloraci3n muestra bacilos peque1os Gram-negativos. El medio de Simmons mantiene el color verde pues el citrato no es utilizado como 3nica fuente de carbono. El caldo glucosa de Clark & Lubs toma un color rojo que indica una fermentaci3n 3cida mixta al a1adir unas gotas de soluci3n acuosa de rojo de metilo. El medio urea de Christensen mantiene el color amarillo pues no es descompuesta la urea. En el medio SIM hay un desarrollo extendido debido a la motilidad de la bacteria, no se colorea de negro pues no genera H₂S y luego de agregar 0,5 mL de reactivo de Kovacs aparece un anillo rojo en 5 minutos indicando la producci3n de indol (21, 35).

Tambi3n se utilizan sondas g3nicas y otros m3todos moleculares para detectar bacterias coliformes y *E. coli*. La reacci3n en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para detectar en el agua los genes que codifican las enzimas marcadoras de la presencia de bacterias coliformes y *E. coli*.

Los criterios que determinan la potabilidad del agua no excluyen totalmente la posibilidad de ingerir enteropat3genos pero, como se necesita una dosis infectiva de varios cientos a miles de bacterias para producir la enfermedad, el riesgo es m3nimo.

En general, los coliformes fecales son competidores d3biles en las bajas concentraciones de sustrato que predominan en las aguas naturales y suelen ser eliminados por competencia y depredaci3n. La temperatura baja del agua, la adsorci3n al sedimento y las condiciones an3xicas, contribuyen de vez en cuando a la supervivencia prolongada de coliformes fecales en

aguas naturales.

Los enterovirus y los quistes de algunos protozoos patógenos son algo más resistentes a la desinfección por cloro u ozono que las bacterias y ocasionalmente se recuperan partículas de virus activas o quistes vivos en aguas tratadas para cumplir las normas sobre coliformes fecales. Hay pruebas de que en algunos países se han producido epidemias por enterovirus y protozoos presentes en el agua potable. Para detectar los virus se deben multiplicar en cultivos de tejidos adecuados y/o revelar por procedimientos inmunológicos. Generalmente, las concentraciones de virus son tan bajas que el primer problema es concentrarlos (81).

El agua procede de subsuelo a través de pozos, o de aguas superficiales como las de ríos, lagos o embalses. En el caso del agua subterránea, a menudo todo lo que se requiere es una desinfección. Las aguas de superficie tienen que tratarse por sedimentación y filtración. Tradicionalmente la desinfección del agua se realiza por cloración. Este tratamiento es relativamente económico y el contenido en cloro libre residual del agua tratada (0,2 - 1 mg/L) es un factor de seguridad intrínseco contra la recontaminación. El inconveniente está en las trazas de compuestos de halogenados que se generan, por tanto se tienen que separar los compuestos orgánicos del agua.

La capacidad del hipoclorito para destruir microorganismos se debe a que el HOCl oxida proteínas y otras moléculas. La actividad del cloro se reduce a pH alcalino. Los quistes de protozoos por su cubierta gruesa son más resistentes, así se necesita 2,8 mg de cloro/L para inactivar el 99% de *Giardia* y 80 mg/L durante más de 90 minutos para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium*. Algunos rotavirus requieren 5 mg de cloro/L para la inactivación y un virus coxsackie 18 mg/L durante 5 minutos (81).

ALIMENTOS

Los productos alimenticios son un buen sustrato para el crecimiento de diversas clases de organismos, aunque muchos no son dañinos, algunos los estropean y otros causan enfermedades y producen toxinas, pero también los hay benéficos. Los

microorganismos bajo condiciones físicas favorables y temperaturas entre 0 y 60°C, crecen produciendo cambios en las características organolépticas y otras cualidades de los alimentos como resultado de la descomposición del sustrato y la síntesis microbiana (77).

El origen de los contaminantes puede ser:

- endógeno
 - alimentos de origen animal, por ejemplo
 - *Salmonella* spp. en la yema de huevo
 - *Trichinella spiralis* en la carne de cerdo o jabalí
 - varios helmintos parásitos en el pescado
 - frutas, hortalizas y cereales
 - una amplia variedad de saprobios
- exógeno
 - contenido intestinal, patas y piel, plumas, de los animales de abasto
 - suelo, aguas superficiales, polvo
 - tracto intestinal y respiratorio humano
 - ambientes de la industrias de alimentos y los restaurantes
 - materias primas
 - restos de alimentos
 - envases
 - aguas residuales
 - roedores, insectos, aves y mascotas (21).

Los factores que influyen en las poblaciones microbianas existentes en los alimentos son:

- ✓ intrínsecos, es decir relativos a las propiedades físicas, químicas y biológicas del alimento: nutrientes, pH y capacidad reguladora, potencial redox, actividad del agua, antimicrobianos;
- ✓ extrínsecos que resultan de las propiedades físicas y químicas del ambiente en el que es mantenido el alimento: humedad relativa, temperatura, atmósfera;
- ✓ efectos del tratamiento o procesado en la elaboración: cortado, lavado, envasado, calor, conservantes;
- ✓ implícitos, que comprenden las interacciones en la comunidad microbiana primaria: velocidad de

crecimiento específico, sinergismo, antagonismo, comensalismo (95).

Los microorganismos que se encuentran en la leche tienen tres orígenes: el interior de la ubre, el exterior de los pezones y el equipo de ordeño. Las bacterias que están fuera del pezón pueden invadir el orificio y desde allí el interior de la ubre. La leche extraída de un animal sano contiene pocos microorganismos, menos de 10^2 – 10^3 ufc/mL. A partir del momento en que se saca la leche de la vaca y hasta que se reparte en los envases, todo lo que se pone en contacto con ella es una fuente potencial de contaminación. Los microbios más comunes son *Micrococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium*. Si el animal tiene mastitis los valores de bacterias pueden llegar a 10^8 ufc/mL de leche acompañadas de alto número de leucocitos.

La superficie de las plantas sanas está siempre contaminada pero generalmente los tejidos internos están libres de microorganismos. La magnitud y el tipo de contaminación está determinado por las características del vegetal, el ambiente donde se ha cosechado, el método de manipulación y el tiempo y las condiciones de almacenamiento. Las frutas y hortalizas son susceptibles a la infección por bacterias, hongos y virus, la invasión puede tener lugar durante el desarrollo de la planta y esto aumenta la posibilidad de su deterioro post-cosecha (77).

La manipulación durante y después de la cosecha puede producir lesiones en los tejidos que facilitan el ingreso de los microorganismos. El pH de las frutas es relativamente ácido, oscilando entre 2,3 en los limones a 5,0 en las bananas. Esto restringe el crecimiento bacteriano pero no afecta a los hongos. La escala de pH de las verduras es ligeramente superior y por ello son más susceptibles al ataque por bacterias.

Las aves recién muertas, desplumadas y evisceradas tienen en la superficie bacterias que están normalmente presentes sobre las aves vivas. Bajo buenas condiciones de procesamiento el recuento oscila entre 10^2 y 10^3 bacterias/cm² de piel. Los principales contaminantes provienen del contenido intestinal y el ambiente, como por ejemplo *Salmonella*, *Campylobacter* y *Pseudomonas*.

El interior de un huevo recién puesto por aves sanas está libre de microbios y la contaminación posterior está determinada por

las condiciones de manipulación así como la temperatura y humedad de almacenamiento. Los microorganismos pueden penetrar en el huevo a través de grietas o cuando se ha deteriorado la fina capa de proteína que recubre la cáscara (95).

La microbiota del pescado y mariscos recién recogidos son el reflejo de la calidad microbiológica de las aguas donde provienen. Las bacterias de la piel y agallas del pescado son principalmente de los géneros *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Vibrio* y *Flavobacterium*. Los mariscos que crecen en aguas contaminadas pueden concentrar virus y ser fuentes de infecciones de hepatitis.

La canal del animal muerto para obtener la carne tiene una contaminación superficial debida a muchas clases de organismos procedentes de varias fuentes tales como el cuero, los pelos o la lana, el contenido intestinal, el personal y el equipo. Los tejidos internos de un animal sano están relativamente exentos de microorganismos. La carne recién cortada de una canal tiene su nueva superficie contaminada con los organismos característicos del ambiente y los instrumentos usados (sierras, cuchillos). La mayor contaminación por formación de nuevas superficies se produce durante la preparación de hamburguesas. El número de bacterias sobre una canal apenas obtenida suele estar entre 10^2 y 10^4 ufc/cm² de superficie expuesta. Los organismos más comunes sobre las carnes frescas son *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, enterobacterias, levaduras y mohos (77).

Las enfermedades transmitidas por alimentos se dividen en tres tipos:

- ingestión de la toxina preformada, como en el caso de la intoxicación por *C. botulinum*, *S. aureus*, *B. cereus*.
- infección no invasora, las bacterias colonizan la luz intestinal, una vez instalado el patógeno suele producir una toxina, por ejemplo *Vibrio cholerae*, *C. perfringens*.
- infección invasora, las células penetran en las células del epitelio intestinal como *Shigella*, *Salmonella*, pero otras atraviesan la pared intestinal y se diseminan por vía hemática por ejemplo *Salmonella typhi*, *Brucella* (95).

Cuadro 4.2. Bacterias patógenas, virus y parásitos más importantes transmitidos por los alimentos (95)

Organismos	Reservorio/portador	Ejemplos de alimentos
<i>Aeromonas</i>	Agua	Agua
<i>Bacillus cereus</i>	Suelo	Arroz cocido, carnes cocidas, hortalizas, budines amiláceos
<i>Brucella</i>	Bovinos, caprinos, ovinos	Leche fresca, productos lácteos
<i>Campylobacter jejuni</i>	Pollos, perros, gatos, bovinos, cerdos, aves salvajes	Leche fresca, aves de corral, agua
<i>Clostridium botulinum</i>	Suelo, mamíferos, aves, peces	Pescado, carne, hortalizas, conservas caseras
<i>Clostridium perfringens</i>	Suelo, animales, hombre	Carnes y aves de corral cocinadas, jugo de carne, porotos
<i>Escherichia coli</i> enterotoxinógeno	Hombre, bovinos, aves de corral, ovinos	Ensaladas, hortalizas crudas, agua
<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno		Leche, agua
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasor		Queso, agua
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico		Carne poco cocida, leche fresca, queso, agua
<i>Listeria monocytogenes</i>	Suelo, hortalizas, bovinos, aves de corral	Quesos blandos, leche, ensalada
<i>Mycobacterium bovis</i>	Bovinos	Leche fresca
<i>Salmonella</i> spp.	Hombre y mamíferos	Carnes, aves de corral, agua, huevos, productos lácteos
<i>Salmonella typhi</i>	Hombre	Agua, hortalizas crudas
<i>Shigella</i>	Hombre	Agua, ensaladas, agua
<i>Staphylococcus aureus</i>	Hombre	Jamón, ensaladas, productos de panadería rellenos de crema, helados, quesos
<i>Vibrio cholerae</i>	Hombre, vida marina	Mariscos, ensaladas, pescado crudo, agua

Organismos	Reservorio/portador	Ejemplos de alimentos
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Agua de mar, vida marina	Pescado crudo, cangrejos, mariscos
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Agua, animales salvajes, cerdos, perros, aves de corral	Leche, carne de cerdo y aves de corral, agua
Virus		
Hepatitis A	Hombre	Agua, mariscos, frutas, hortalizas crudas
Rotavirus	Hombre	Agua
Protozoos		
<i>Cyclospora</i>	Animales	Agua
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Hombre, animales	Agua, leche fresca, embutido crudo no fermentado
<i>Entamoeba histolytica</i>	Hombre	Hortalizas, frutas frescas
<i>Giardia lamblia</i>	Hombre, animales	Agua
<i>Sarcocystis</i>	Bovinos, ovinos	Carnes
<i>Toxoplasma</i>	Gato	Cerdos, ovinos, aves de corral
Helmintos		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Hombre	Alimentos contaminados con suelo
<i>Taenia saginata</i>	Bovinos	Carne poco cocida
<i>Taenia solium</i>	Cerdos	Carne de cerdo poco cocida
<i>Trichinella spiralis</i>	Cerdos, carnívoros	Carne de cerdo poco cocida
<i>Trichuris trichiura</i>	Hombre	Alimentos contaminados con suelo

Los cambios debidos a la alteración de alimentos frescos y elaborados causados por los microorganismos pueden ser:

- formación de viscosidad o limo extracelular, como el generado en la carne refrigerada por el crecimiento de organismos psicrófilos o psicrotrofos;
- despolimerización o hidrólisis de carbohidratos, proteínas y grasas, ocasionando la pérdida de la organización biológica del alimento, por ejemplo la maceración de las zanahorias por *Rhizopus*;

- destrucción de un emulsionante, como la lecitina en los ovoproductos causada por *Bacillus cereus*;
- fermentación de un azúcar acumulando ácidos orgánicos o produciendo cambios molestos en el aroma, como la acidificación de la leche por *Streptococcus* o la formación de diacético por *Pediococcus* en la cerveza;
- oxidación de un producto que determina variación en el aroma y la apariencia, por ejemplo el agriado del vino por *Acetobacter*;
- producción de un pigmento, como las manchas rojas del queso debidas a *Lactobacillus plantarum*;
- reducción de un compuesto que produce un olor extraño o un cambio de color, como el ennegrecimiento de hortalizas encurtidas por *Desulfotomaculum* al reducir sulfatos;
- formación de un olor o aroma desagradable, por ejemplo la trimetilamina en los pescados descompuestos (97).

Los microorganismos más importantes que deterioran los alimentos enlatados con defectos de elaboración, son los formadores de endosporos y el mayor riesgo es la producción de toxinas por *Clostridium botulinum* (77).

Todos los métodos de conservación de alimentos están basados en uno de los siguientes principios:

- prevención de la contaminación,
- inhibición del crecimiento y metabolismo microbiano,
- matar los microorganismos.

Los métodos de conservación deben tener en cuenta la extraordinaria resistencia de las esporas bacterianas frente a agentes tales como el calor, los productos químicos y la deshidratación.

Las cubiertas protectoras como la cáscara de los huevos, la piel de las frutas y verduras, la cascarilla de los cereales, son barreras naturales para los organismos dañinos, mientras que los envases protegen a los alimentos elaborados (97).

El calor es ampliamente utilizado para destruir los organismos que hay en los productos alimenticios en latas y frascos. En los productos muy ácidos la temperatura no sobrepasa la de

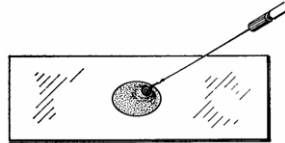
ebullición pues los endosporos sobrevivientes de *C. botulinum* no germinan a pH por debajo de 4,5, mientras que los alimentos poco ácidos y neutros se aplica la esterilización en autoclave para matar los endosporos.

Recuento microscópico directo

Marcar con un lápiz graso, un círculo de 1 cm² sobre un portaobjetos. Depositar 0,01 mL con un asa calibrada de la dilución de alimento y extenderlo dentro de la superficie marcada. Secar al aire y fijar con metanol durante 3 minutos. Colorear unos 30 segundos con solución de azul de metileno alcalina. Lavar, secar y colocar una gota de aceite y un cubreobjetos, y sobre éste otra gota de aceite para observar por inmersión.



Contar las células de varias decenas de campos (de 0,02 mm² para la mayoría de los objetivos de inmersión). Dividir el número de microbios por el número de campos observados. Calcular el número de células correspondiente a un cm² o sea contenidas



en el volumen depositado. Obtener el número/mL de dilución y multiplicar por la inversa de ésta para hallar el número total de microorganismos/g o mL de alimento.

Un asa de 4 mm de diámetro interno hecha con alambre Ni-Cr de 0,457 mm de diámetro, carga aproximadamente 10 µL (25).

La pasterización que se utiliza para la leche y algunos otros productos consiste en un tratamiento a una temperatura de 63°C durante 30 minutos, o de 72°C durante 15 segundos. Deben tomarse las necesarias precauciones para evitar la contaminación después de la pasterización y el producto acabado debe almacenarse a baja temperatura para retrasar el crecimiento de los microorganismos que han sobrevivido. El tratamiento de ultra alta temperatura (UAT) consiste en calentar la leche a 135-150°C durante 4 segundos (97).

Las temperaturas de congelación retrasan el crecimiento y frenan las actividades metabólicas de los microorganismos durante largos periodos de tiempo. Antes de ser congelados, la mayoría de los vegetales son sometidos a la acción del vapor de agua para inactivar las enzimas que podrían alterar al producto aún a bajas temperaturas. Los métodos de congelación rápida

usan temperaturas de -25°C o menores para formar cristales de hielo pequeños que no rompen las estructuras celulares del alimento. El número y los tipos de microorganismos viables presentes en los alimentos congelados reflejan el grado de contaminación del producto bruto, las condiciones sanitarias de la planta de elaboración y, la velocidad y el cuidado con que se elaboró el producto.

El recuento microbiano de la mayoría de los alimentos congelados disminuye durante el almacenamiento, pero por ejemplo algunas especies de *Salmonella* sobreviven durante largos períodos de tiempo entre -9 y -17°C . El crecimiento de bacterias toxigénicas como *C. botulinum* tipos A y B proteolítico, y *S. aureus* puede evitarse a temperaturas de 5°C , pero *C. botulinum* tipo E crece a $3,3^{\circ}\text{C}$.

Cuando los microorganismos se colocan en soluciones con grandes cantidades de azúcar (jaleas y mermeladas) o sal (carnes curadas) las células se deshidratan y el metabolismo se detiene, retrasando o evitando el crecimiento. Los procesos de conservación basados en este principio afectan sobre todo a las bacterias, mientras que las levaduras y mohos son relativamente resistentes. La elevada presión osmótica puede inhibir el crecimiento microbiano, pero no elimina a todos los organismos.

Los ácidos orgánicos son utilizados como conservadores de alimentos, entre los más efectivos están los ácidos benzoico, sórbico, acético, láctico y propiónico. Los ácidos sórbico y propiónico se usan para inhibir el crecimiento de los mohos en el pan. Los alimentos preparados por procesos de fermentación, por ejemplo encurtidos, yogur y quesos, están conservados principalmente por los ácidos acético, láctico o propiónico producidos durante la fermentación (77).

Los nitratos y nitritos son aditivos usados en el curado de carnes pues, aunque tóxicos, inhiben algunas bacterias anaeróbicas especialmente *C. botulinum* (77). Por otra parte, las buenas prácticas de manufactura incluyen procedimientos que permiten obtener productos de calidad microbiológica conveniente, mediante el control en la cadena de elaboración (95).

TOXINAS

Las enterotoxinas son exotoxinas que actúan en el intestino delgado causando una secreción masiva de fluido en el lumen intestinal que provoca vómitos y diarrea. Son producidas por una variedad de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, cepas de *Escherichia coli*) (1).

Algunas bacterias Gram-negativas (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*) producen lipopolisacáridos tóxicos (endotoxinas) que forman parte de capa externa de la pared celular. Estas moléculas producen una variedad de efectos fisiológicos: diarrea, fiebre, inflamación, disminución de los leucocitos y las plaquetas.

La toxina botulínica es una serie de siete neurotoxinas (A-G) relacionadas y son las más potentes que se conocen, pues un miligramo es suficiente para matar un millón de pollos. La muerte es debida a una falla respiratoria por la parálisis muscular. La toxicidad se debe a la unión de la toxina con las membranas presinápticas sobre la terminación de las neuronas motoras esimuladoras en la unión neuromuscular, bloqueando la liberación de acetilcolina. El botulismo es producido *Clostridium botulinum* y otros clostridios estrechamente relacionados (1).

Cuando hay desequilibrios en las poblaciones del plancton marino los dinoflagelados, tales como *Gonyalux*, crecen en suspensiones densas llamadas floraciones, de color rojo debido a las xantófilas presentes como pigmentos accesorios de la fotosíntesis en estos organismos. Tales floraciones o marea roja indican la polución de las aguas asociada con la muerte de peces y el envenenamiento de los humanos que consumen los mariscos debido a las potentes neurotoxinas producidas (46).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos para los animales. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados y secundaria al comer carne o leche de animales que ingirieron forrajes contaminados, por ejemplo la presencia de aflatoxina M₁ en la leche es consecuencia de la ingesta de aflatoxina B₁ por la vaca (98). Los primeros casos de micotoxicosis fueron descritos en la Argentina en 1912 (99).

La presencia de las micotoxinas en los vegetales puede deberse a la infección de la planta en el campo por un hongo patógeno, la

colonización de la filósfera por uno saprobio, el crecimiento post-cosecha sobre frutos y granos almacenados, o el desarrollo fúngico durante el depósito de los materiales ya procesados. Se conocen unas 300 toxinas fúngicas.

Las micotoxinas son específicas. La aflatoxina B₁ es formada por tres especies estrechamente relacionadas: *Aspergillus parasiticus*, *A. nomius* y *A. flavus* (25). Las esporidesminas son producidas solamente por *Pithomyces chartarum*. La patulina es generada por unas once especies de *Penicillium*, tres de *Aspergillus* y dos de *Byssoschlamys*.

Es grande la variabilidad en la formación de toxinas por una especie dada. *Penicillium roqueforti* produce algunas en las condiciones de laboratorio pero no en los quesos madurados. Los rendimientos de toxina T-2 por cepas de *Fusarium sporotrichioides* varían considerablemente y no todas las cepas de *A. flavus* son aflatoxigénicas. Los tricotecenos están asociados a cereales de zonas templadas, mientras que las aflatoxinas se encuentran con más frecuencia en oleaginosas y cereales de zonas cálidas. También influyen las prácticas agrícolas (98).

La presencia de una micotoxina y el peligro asociado solamente pueden ser determinados con certeza después de la extracción e identificación de la toxina, porque: la presencia del hongo no asegura que exista una micotoxina, ésta continúa en el producto aunque el moho haya desaparecido, un hongo dado puede producir más de una toxina y una determinada micotoxina puede ser formada por más de una especie de mohos. Las concentraciones se expresan en µg/kg, o sea una relación de 1/10⁹, y la acción de estas pequeñas cantidades es acumulativa (25).

El nivel de aflatoxinas en los vegetales es muy variable, oscilando los valores en choclo y maíz entre 0,1 y 2.000 µg/kg, Estas toxinas producen daño hepático agudo, cirrosis, inducción de tumores y teratogénesis. Se excretan por leche y se acumulan en los tejidos (98).

La contaminación de productos agrícolas con fumonisinas pueden alcanzar valores de hasta 330 mg/kg, principalmente en los destinados al consumo animal. Estas micotoxinas producen

leucoencefalomalacia equina, edema pulmonar porcino y cancer hepático en ratas. Se excretan por la leche (100).

La ocratoxina A produce nefropatía en cerdos y aves, y se acumula en riñón, hígado y músculo. Los valores presentes en granos han llegado hasta 5 mg/kg.

Los tricotecenos (diacetoxiscirpenol, desoxinivalenol, toxina T-2 y otros) causan diarrea, hematuria, vómitos, anorexia, leucopenia, necrosis y en algunos casos letales hemorragias múltiples. Por otra parte, la zearalenona es hiperestrogénica, los psoralenos originan fotodermatitis y los tremógenos (penitrem A y otros) afectan al sistema nervioso provocando temblores y convulsiones en los animales.

Una vez formadas las micotoxinas no se pueden eliminar durante el procesamiento culinario o industrial, aunque en unos pocos casos se reduce su contenido. Las micotoxinas son moderadamente estables a los procedimientos de tostado, así los maníes pierden alrededor del 40% de aflatoxina B₁ y los granos de café verde cerca del 80% de ocratoxina A. El proceso de panificación reduce en un 16 a 69% el desoxinivalenol presente en la harina de trigo. El tratamiento de maíz quebrado con NaOH disminuye significativamente el contenido de aflatoxina, pero la preparación del grano entero con Ca(OH)₂ reduce sólo un 40% de la misma (98).

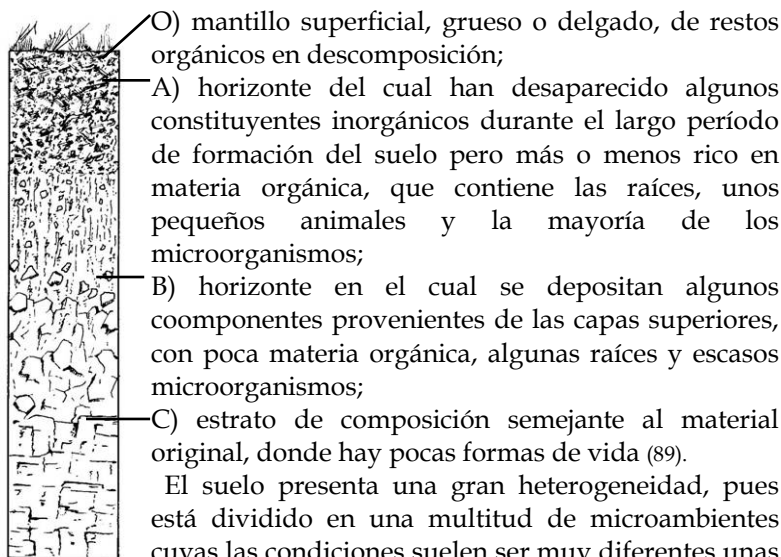
SUELO

El suelo está formado por cinco componentes principales: minerales, agua, aire, materia orgánica y seres vivos, cuya proporción no es la misma en todos los suelos. El aire y el agua juntos representan alrededor de la mitad del volumen del suelo. El agua se mueve por acción de la gravedad atravesando los poros más grandes y una parte es retenida por interacciones con los otros constituyentes inertes, siendo aprovechada por los organismos vivos sólo una fracción de la misma.

La aireación y la humedad están interrelacionadas, ya que los poros que no contienen agua están llenos de gas. La atmósfera subterránea es diferente de la superficial porque tiene menos O₂ y

comúnmente de diez a cien veces más CO_2 debido a la actividad biológica (69).

Un corte vertical del suelo revela el perfil definido por las capas horizontales:



O) mantillo superficial, grueso o delgado, de restos orgánicos en descomposición;

A) horizonte del cual han desaparecido algunos constituyentes inorgánicos durante el largo período de formación del suelo pero más o menos rico en materia orgánica, que contiene las raíces, unos pequeños animales y la mayoría de los microorganismos;

B) horizonte en el cual se depositan algunos componentes provenientes de las capas superiores, con poca materia orgánica, algunas raíces y escasos microorganismos;

C) estrato de composición semejante al material original, donde hay pocas formas de vida (89).

El suelo presenta una gran heterogeneidad, pues está dividido en una multitud de microambientes cuyas las condiciones suelen ser muy diferentes unas de otras, lo que explica por ejemplo la presencia de bacterias y actinobacterias neutrófilas y/o alcalófilas en suelos ácidos, o desnitrificantes en suelos bien aireados.

Los soportes orgánico y mineral no son inerte. Los diversos procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren están íntimamente intrincados, por ejemplo los productos del metabolismo microbiano suelen ser sustraídos provisoriamente del proceso de biodegradación por adsorción sobre coloides (estabilización) (6).

La energía necesaria para el desarrollo de los microorganismos heterotróficos que constituyen la mayoría de las poblaciones del suelo, proviene indirectamente de la fotosíntesis. También hay una micro y mesofauna que suelen intervenir activamente en los procesos del suelo (6).

Además, el suelo constituye un reservorio de microorganismos que se están domesticando con el fin de aumentar la productividad agrícola de una manera sustentable (101).

Los efectos benéficos de los microbios del suelo son amplios y van desde la fijación de nitrógeno y la descomposición de la materia orgánica hasta la hidrólisis de agroquímicos y subproductos metabólicos, y el mejoramiento de la biodisponibilidad de nitratos, sulfatos, fosfatos y metales esenciales (102).

No están distribuidos uniformemente en el suelo debido al mosaico discontinuo de microambientes, donde los favorables para el desarrollo microbiano se caracterizan por su limitada extensión en el espacio y el tiempo. La dispersión de los microorganismos, con excepción de los fototróficos, sigue la distribución vertical de los nutrientes pero es alterada por otros factores, como la composición de la atmósfera del suelo, el pH, la humedad, la cantidad de minerales asimilables y la presencia de sustancias antimicrobianas (6).

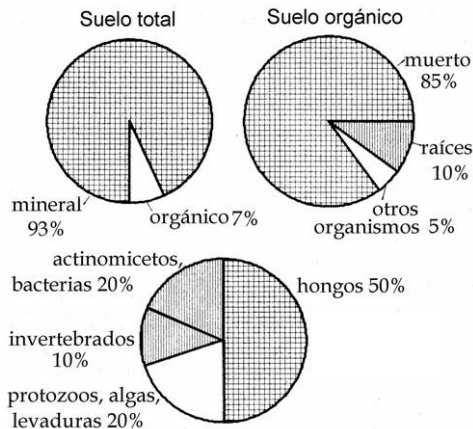


Figura 4.2. Biomasa del suelo (10).

La curva más frecuentemente observada en la distribución vertical de las bacterias y hongos es de tipo decreciente, donde la densidad microbiana que alcanzó un máximo muy cerca de la superficie disminuye progresivamente con la profundidad. La reducción en los primeros centímetros de suelo se debe a la acción de la luz solar y la desecación. En el caso de ciertos suelos forestales donde el mantillo aporta sustancias inhibitoras que no son biodegradadas rápidamente en el horizonte superior, la densidad microbiana aumenta en la capa intermedia y la curva es de tipo convexo.

Si los compuestos inhibidores de origen vegetal o sintetizados por otros microorganismos, se acumulan en el horizonte intermedio y hay un estímulo en la profundidad debido a la base

calcárea que aumenta el pH, la curva es de tipo cóncavo porque la densidad microbiana es mayor tanto en la superficie como en la profundidad, aunque esta distribución es rara.

La distribución de las cianobacterias y algas está regida por la luz y la humedad. En los suelos saturados con agua están en la superficie o los primeros milímetros, en los no saturados dentro del primer centímetro dependiendo de la posibilidad de penetración de la luz, mientras que en los suelos halomorfos donde la eflorescencia salina forma una costra transparente pueden hallarse en los tres primeros centímetros del perfil. El agua suele arrastrar las células más abajo pero solo aquellas especies capaces de cambiar a un metabolismo heterotrófico pueden sobrevivir.

La distribución horizontal de los microorganismos está ligada a la macroheterogeneidad del suelo y puede ser debida a la acción de la vegetación que modifica el ambiente superficial, por ejemplo la acidificación producida por el mantillo de *Pinus*, y al efecto de las raíces (6).

En muchos de los reconocimientos de las especies pro y eucarióticas se han empleado técnicas de cultivo, pero también se suelen detectar los genes del ARN ribosómico o el ADN, por diversas técnicas de la biología molecular, para evaluar las comunidades microbianas (103).

Las bacterias Gram-negativas (*Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*) predominan en número respecto a las Gram positivas (*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*). En cuanto a las actinobacterias, los géneros más abundantes son *Streptomyces* y *Nocardia*, con menos frecuencia se hallan *Micromonospora*, *Actinomyces* y otros (89).

Los géneros más representativos de mixobacterias del suelo son *Myxococcus*, *Chondrococcus*, *Archangium* y *Polyangium* (46). Entre las principales poblaciones fototróficas se encuentran las cianobacterias *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Plectonema*, *Schizothrix*, *Scytonema* y *Tolypothrix* (104).

Los géneros de hongos que tienen especies representativas en la mayoría de los suelos son *Absidia*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Gymnoascus*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Gliomastix*, *Memnoniella*, *Rhizoctonia*, *Stachybotrys* y *Zygorhynchus*. También es común hallar micelio de basidiomicetos, mixomicetos y oomicetos (53). Las levaduras *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces* y *Rhodotorula* se encuentran en una amplia variedad de suelos (105).

El cálculo del número de microorganismos varía de acuerdo al método con el cual se determina. El recuento en placa da valores menores porque muchos son incapaces de crecer en los medios comunes, pero las estimaciones hechas por las técnicas de recuento microscópico son superiores debido a que suelen contarse los organismos muertos (66).

La biomasa microbiana se puede determinar sea por el contenido de lípidos bacterianos o ergosterol fúngico, el uso de parámetros fisiológicos tales como respiración o cantidad de ATP (74, 81).

Las interacciones entre los vegetales y los microorganismos del suelo se manifiesta de modo especial en zona que está en contacto con las raíces (rizósfera). Las poblaciones microbianas son modificadas por la estimulación, o la inhibición, debida a los exudados radicales y restos tisulares. En las diferentes partes de un mismo sistema radical, no sólo varía la intensidad del efecto rizosférico sino también la colonización de la superficie de las raíces (rizoplano) (6).

Cada especie o variedad de planta induce un efecto rizosférico característico que desaparece progresivamente cuando las raíces envejecen, dando lugar a la proliferación de los microorganismos que intervienen en la descomposición de los tejidos vegetales muertos (69). Las raíces de una planta de cebada exudan, en sus primeros diez días, de 0,4 a 0,5 mg de materia orgánica constituida principalmente por aminoácidos y otras sustancias de bajo peso molecular fácilmente aceptadas por los microorganismos (106).

Los exudados radicales suelen estimular el crecimiento de bacterias y actinobacterias que sintetizan sustancias

antimicrobianas, enzimas o sideróforos, y son antagonistas de bacterias y hongos patógenos.

Los microbios rizosféricos y simbióticos están en estrecha interrelación pues si se favorece la colonización de unos, se influye en la efectividad de otros, como en el caso de *Streptomyces lydicus* que causa cambios positivos en los nódulos de las plantas de arvejas (107), o de algunos hongos micorrizantes que pueden alterar la composición de las poblaciones bacterianas por cambios fisiológicos de la planta hospedador o modificaciones en la composición de los exudados radicales (102).

Los factores ecológicos físicos (humedad, temperatura, luz) actúan directamente sobre las poblaciones rizosféricas o indirectamente por intermedio de la planta modificando la calidad y cantidad de los exudados radicales. La elevación de la humedad del suelo por sobre un cierto nivel puede modificar considerablemente el equilibrio microbiano. La atmósfera de la rizósfera se caracteriza por una concentración alta de CO₂ proveniente tanto de la planta (2/3) como de los microorganismos (1/3) (69). La temperatura actúa directamente sobre los microorganismos del suelo no rizosférico, pero también indirectamente controlando los exudados radicales correspondientes a las temperaturas óptimas de crecimiento de las plantas.

Se denomina microorganismos promotores del crecimiento vegetal a la población que vive en la rizosfera y como endófito intra o extracelular del tejido vegetal sano, con capacidad para suprimir a los fitopatógenos y/o estimular el crecimiento vegetal (101). Los microorganismos endotróficos residen dentro de las células, en el espacio intercelular o en el sistema vascular de la planta y provienen de la semilla o el ambiente circundante. Son detectados por cultivos después de la esterilización superficial de las raíces. En algunos casos pareciera que las plantas escogen a los endófitos, por ejemplo en la rizósfera de maíz predominan *Enterobacter* spp. y *Burkholderia* spp. (103).

Las bacterias endotróficas tienen algunas ventajas competitivas sobre las rizosféricas debido a que la disponibilidad de nutrientes es mayor en el interior de las plantas y se encuentran mejor protegidas de las condiciones ambientales adversas que las

rizosféricas. Por otra parte pueden brindar beneficios directos a su hospedador excretando fitohormonas o sustancias que inhiben el crecimiento de los patógenos.

Entre las bacterias consideradas dentro del grupo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal se encuentran especies productoras de antimicrobianos (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*) y fitohormonas (*Azospirillum*), y fijadoras de nitrógeno (*Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*). Numerosas actinobacterias son colonizadoras de las raíces y endófitos biológicamente activos, por ejemplo *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora*, y *Nocardia* (101).

En cambio, el papel de los hongos del suelo es complejo, pues por un lado constituyen el grupo principal de los fitopatógenos, pero por el otro participan en el ciclo de los nutrientes, estimulan el crecimiento de las plantas, descomponen los residuos vegetales, producen antibióticos o son antagonistas de patógenos. *Trichoderma* es un hongo antagónico de algunos fitopatógenos del suelo que suele colonizar la rizósfera y el rizoplano (102).

En la rizósfera los microorganismos suelen originar sustancias que estimulan el desarrollo de las plantas en concentraciones muy bajas. Varios microorganismos producen ácido indol-acético, como *Azospirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Pseudomonas putida* (108-110), y citoquininas, por ejemplo *Azotobacter vinelandii*, *Methylobacterium* y *Rhizobium* (111, 112).

Entre los hongos formadores de citoquininas se hallan *Agaricus*, *Boletus*, *Coprinus*, *Rhizopus* y *Suillus*, y de auxinas, especies de *Aspergillus*, *Boletus*, *Penicillium* y *Rhizopus* (80). Diferentes especies de hongos que están asociados la rizósfera y el rizoplano de plantas hortícolas, sintetizan giberelinas, entre ellos *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. corylophilum*, *P. funiculosum* y *Rhizopus stolonifer*, además de patógenos como *Fusarium oxysporum* y *Gibberella fujikuroi* (113). También unos pocos actinobacterias (*Streptomyces*) y bacterias (*Azospirillum brasiliense*, *A. lipoferum*) producen estas fitohormonas (114).

Numerosos organismos rizosféricos producen y excretan antibióticos y surfactantes que pueden ser absorbidos por las raíces o modificar el equilibrio entre las poblaciones microbianas, pero tal actividad está limitada a unos pocos microambientes

favorables (115). Los biosurfactantes herbicolina A, iturina A y surfactina suelen alcanzar en suelo una concentración de 2,3-3; 0,4-5 y 1,7-11,4 µg/g, respectivamente (81).

Los *Streptomyces* son organismos ampliamente distribuidos en el suelo que originan más del 70% de los antibióticos conocidos, pero menos del 10% inhiben a todas las bacterias rizosféricas y más del 40% no inhiben prácticamente a ninguna debido a que la probabilidad de la formación de antibióticos no es la misma en todos los microambientes (116).

BACTERIAS FIJADORAS DEL NITRÓGENO

Se consideran diazótrofos de vida libre a los que no poseen necesariamente un socio vegetal simbiótico, aunque a veces también puedan actuar como endófitos.

La reducción del N₂ es un proceso inhibido por el oxígeno y las células de las bacterias aeróbicas presentan diversos mecanismos de protección que incluyen, entre otros, la producción de una capa mucosa que retarda la difusión del O₂ por ejemplo *Azotobacter vinelandii*, o la formación de células especiales (heterocistos) como ocurre en las cianobacterias.

Los *Clostridium* diazotróficos proliferan en los microambientes anóxicos de los agregados del suelo o en consorcios donde los organismos facultativos consumen rápidamente el oxígeno por la respiración. La mayoría de los fijadores son mesofílicos pero *Streptomyces thermoautotrophicus* es activo hasta 75°C (1).

El interior de las plantas es un ambiente propicio para la fijación de nitrógeno por las bacterias endotróficas, debido a la baja concentración de oxígeno y la presencia de glúcidos fácilmente aprovechables. Entre los organismos diazotróficos endófitos se encuentran especies de *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (117).

Bacterias simbióticas son las que se asocian a la planta en un verdadero órgano de fijación del nitrógeno: el nódulo. A este grupo pertenecen los distintos géneros de rizobios y otras pocas bacterias (*Burkholderia tuberum*, *Methylobacterium nodulans*, *Ralstonia taiwanensis*) que nodulan con leguminosas, y un

actinomiceto (*Frankia*) que forma actinorrizas en plantas de otras familias (118, 119).

Una particularidad de las plantas leguminosas es su capacidad para asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* y otros relacionados. Esta simbiosis se manifiesta por el desarrollo del nódulo en cuyo interior se multiplican las bacterias y transforman el nitrógeno del aire en amonio. La asimilación de ese amonio por parte de las plantas les permite crecer en suelos pobres en nitrógeno (120).

En la primera etapa, la planta excreta un exudado radicular con flavonoides que atraen a los rizobios por quimiotactismo y activan en las bacterias la expresión de ciertos genes que determinan la producción de moléculas fundamentales para el reconocimiento y la infección de la planta. Las bacterias se adhieren mediante proteínas específicas, a los pelos absorbentes de la raíz e inducen la curvatura del extremo de los mismos mediante la liberación de lipooligosacáridos conocidos como factores de nodulación (Nod) (121).

Cuando los pelos radicales jóvenes se han doblado lo suficiente como para atrapar al rizobio en un bolsillo de pared celular del hospedador, ésta es hidrolizada y

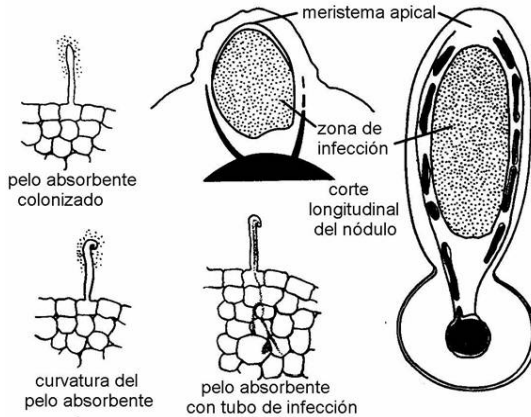


Figura 4.4. Formación de un nódulo (6)

la bacteria penetra por invaginación de la membrana citoplasmática. La planta reacciona depositando una nueva pared celular alrededor de la lesión, y genera un tubo de infección que crece hacia adentro por donde los rizobios avanzan hacia la base del pelo, internándose en la raíz hasta arribar al citoplasma de las células meristemáticas (120).

Simultáneamente con la formación del tubo, las células de la corteza interna de la raíz se dividen y forman el primordium nodular. La multiplicación intensa de estas células provoca la aparición del nódulo, que es un verdadero órgano especializado en el intercambio metabólico entre ambos asociados. Las simbiosis entre rizobios y leguminosas son muy específicas, por ejemplo *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* induce la nodulación en el poroto pero no en la alfalfa (121).

Cuadro 4.3. Principales simbiosis de leguminosas (1)

Hospedante	Simbionte
Haba, arveja, lenteja	<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>
Poroto	<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i>
	<i>Rhizobium tropici</i>
Trébol	<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i>
Soja	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	<i>Sinorhizobium fredii</i>
Alfalfa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Lotus</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>
<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>

Las bacterias no se mezclan con los orgánulos citoplasmáticos, sino que se mantienen confinadas en los simbiosomas que son vesículas protegidas por membranas. Los simbiosomas del lupino tienen una sola bacteria, los de la soja varias. La membrana del simbiosoma actúa a modo de barrera que controla el flujo de ácidos carboxílicos (malato, succinato, fumarato) que constituyen la fuente de carbono para los bacteroides. Tales ácidos proceden de la oxidación de azúcares sintetizados en las hojas por la fotosíntesis.

Durante el proceso de formación de los simbiosomas, las bacterias se van transformando en bacteroides, grandes e irregulares, que generan diversas proteínas específicas como la enzima nitrogenasa y algunos citocromos. Las células intersticiales sin infectar intervienen en las últimas etapas de la síntesis de ureidos, asparagina o glutamina, por incorporación del

amonio recibido desde el bacteroide, y éstos se exportan hacia la parte aérea a través de los vasos del xilema (120).

Para que los nódulos de las leguminosas fijen nitrógeno es imprescindible que contengan leghemoglobina cuyo grupo hemo es sintetizado por el vegetal (122). La fijación de nitrógeno requiere gran cantidad de energía que se produce en los bacteroides durante la oxidación de los ácidos dicarboxílicos y la leghemoglobina transporta el O₂ a una concentración baja pero estable, que permite mantener una elevada actividad respiratoria sin afectar la nitrogenasa, pues esta enzima se inactiva en presencia de oxígeno. Los bacteroides tienen forma irregular, son más grandes que los bacilos originales y acumulan poli-β-hidroxibutirato (1).

En general hay dos tipos de nódulos, uno indeterminado y alargado (arveja, alfalfa) y otro determinado y globoso (soja, poroto). Los nódulos indeterminados se alargan debido a la presencia de un meristema persistente localizado en el ápice. Una sección longitudinal del mismo muestra zonas con células infectadas en distintos estadios y una diferenciación progresiva de los simbiosomas. En cambio los nódulos determinados son globosos, originados en un meristema esférico que no se aprecia en la madurez, y las células infectadas y los simbiosomas se encuentran en una etapa de diferenciación similar (120).

Examen de nódulos radicales

Reconocer los nódulos en la raíz de una leguminosa, medirlos y dibujar su forma. Cortarlo y observar el color. Aplastarlo entre dos portaobjetos. Extender el material interno mezclado con una gota de agua, secar y fijar por calor.

Colorear con fucsina fenicada durante 30 segundos, lavar con agua y secar. Depositar una gota de aceite de inmersión, apoyar un cubreobjetos y sobre éste poner otra gota de ese aceite. Observar al microscopio los bacteroides coloreados de rojo (17).

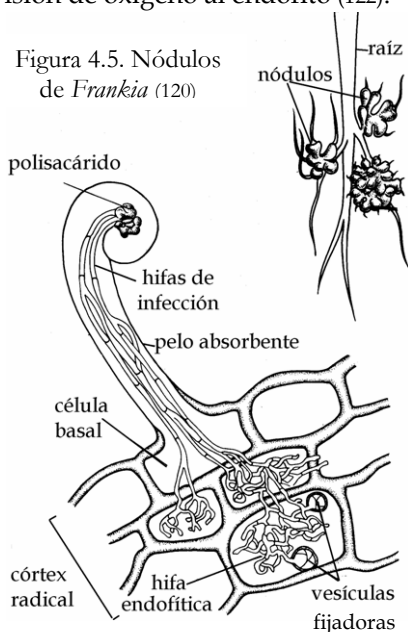
Hay dos grupos de genes esenciales para la nodulación. Uno, incluye los implicados en la formación de la pared celular bacteriana que determinan la síntesis de exo y lipopolisacáridos. El otro, comprende a los genes de nodulación (nod), que en muchas especies de rizobios residen en un plásmido (Sym) junto

a los genes de fijación (*nif*). En general los genes de nodulación no están expresados, pero son inducidos por la presencia del hospedador. La principal función de los genes *nod* es la síntesis de proteínas de reconocimiento de los flavonoides específicos excretados por la planta asegurando el intercambio de señales entre ambos simbioses.

La presencia en el suelo de especies de rizobios promiscuas suelen generar nódulos inefectivos en plantas no específicas. No todas la cepas efectivas en un hospedador particular son capaces de fijar nitrógeno, debido a las diferencias varietales y a la interacción con los suelos y sistemas de producción, por ejemplo la ausencia de nódulos puede indicar un bajo pH o una deficiencia de fósforo en el suelo (124).

Varias dicotiledóneas, que no pertenecen a las leguminosas, poseen nódulos en las raíces capaces de fijar N_2 asociadas con actinobacterias del género *Frankia*. Los nódulos, conocidos como actinorrizas, son raíces laterales modificadas y contienen una hemoglobina que facilita la provisión de oxígeno al endófito (122).

Algunos árboles, como alisos y casuarinas, forman los nódulos les proporcionan entre 70 y 90% del nitrógeno total necesario. Crecen en suelos empobrecido por lo que son útiles para reforestación y en plantaciones mixtas con especies arbóreas valiosas. La eficacia de la simbiosis entre *Frankia* y las plantas leñosas está principalmente determinada por los factores ambientales como el pH, el potencial matricial del suelo y la disponibilidad de nitrógeno o fósforo. La inoculación de plantines con cepas de *Frankia* mejora, mediante la simbiosis, el crecimiento de planta y



disponibilidad de nitrógeno. De esta manera pueden establecerse la actinobacteria en los nódulos de la raíz bajo condiciones que no favorecen la nodulación por la población indígena y como los nódulos son perennes, el efecto positivo puede continuar durante varios años. Sin embargo, la capa introducida debe competir para la formación de los nódulos, permanecer activa en los mismos y sobrevivir en la rizósfera.

La población de la actinobacteria puede mantenerse activa en el suelo por la presencia de vegetación que favorece su crecimiento saprofítico pues coloniza la superficie radical obteniendo nutrientes de los exudados y sigue siendo infectiva aún en suelos desprovistos del hospedador específico. También puede obtener recursos de la descomposición de la materia orgánica muerta (125).

MICORRIZAS

Las plantas parecen totalmente autónomas pero la mayoría tienen en sus raíces hongos asociados formando micorrizas, cuya función más importante es absorber los elementos minerales menos móviles del suelo y transferirlos a la planta hospedadora mientras ésta proporciona compuestos carbonados al hongo. Hay dos tipos básicos de asociación: las ectomicorrizas y las endomicorrizas.

Observación de micorrizas

Lavar la raíz con agua corriente.. Cortar en porciones de un centímetro de largo y colocarlos en solución de hidróxido de sodio o potasio al 10% p/v. Calentar a 90°C durante 30 minutos o más si es necesario. Cuando el material es obscuro sumergirlo en agua oxigenada de 10 volúmenes durante 15 minutos, sino omitir este paso. Lavar 4 veces con agua corriente. Poner los trozos en solución de ácido clorhídrico 0,1 N durante 10 minutos. Colorear con azul-lactofenol a 90°C por 5 minutos. Pasar a lactofenol. Colocar un trozo de la raíz tratada entre dos portaobjetos y aplastarla. Observar al microscopio entre porta y cubreobjetos. La solución colorante se prepara mezclando 5 mL de solución acuosa de azul de algodón o azul tripán o azul de anilina al 1% p/v, con 95 mL de lactofenol (127).

Cuando el hongo penetra en el interior de las células de la raíz formando minúsculas arborescencia y a veces vesículas que almacenan lípidos, se las llama endomicorrizas arbusculares y generalmente están presentes en la vegetación herbácea (123). Los

simbiontes más comunes son micromicetos de los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* y otros glomeromicetos, cuyo micelio forma una extensa red en el suelo alrededor de las raíces micorrizadas (127).

Las raíces se infectan con las hifas desarrolladas a partir de los propágulos presentes en el suelo, que pueden ser esporas o clamidosporas, cuya colonización es favorecida por algunas bacterias rizosféricas (128).

Los hongos micorrícicos pueden estimular el crecimiento de los vegetales, y algunos ayudan a regular el microambiente alrededor de las raíces y prevenir la infección de las plantas (129). El hongo suministra nutrientes minerales al hospedador,

especialmente fósforo. Las hifas extrarradicales captan el fosfato del suelo a través de un transportador y allí es condensado en polifosfato, el que luego es trasladado por la corriente citoplásmica a las hifas intrarradicales (130). Las bacterias diazotróficas proveen a las legumbres una fuente adicional de nitrógeno, pero requieren gran cantidad de energía y fósforo. Por tal motivo estas plantas se asocian con hongos endomicorrícicos que son eficientes proveedores de fosfatos (131).

Hay otros tipos de endomicorrizas como las que forman ovillos intracelulares en las orquídeas, donde cada una de las diferentes especies del vegetal tiene una alta especificidad por un simbionte particular, generalmente un basidiomiceto. El grado de interdependencia entre los asociados es tal, que en muchos casos la planta no pueden ser cultivada sin el hongo (61).

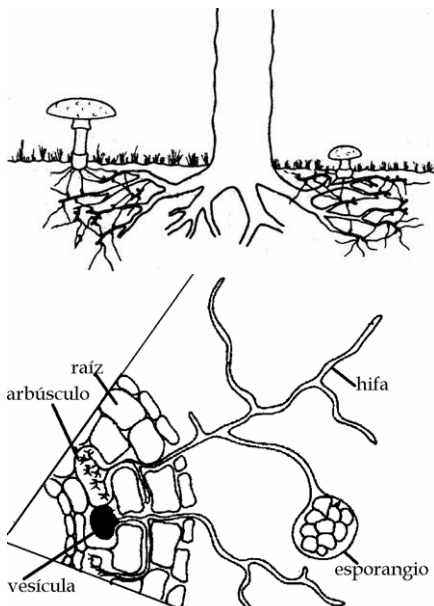


Figura 4.6. Endomicorriza arbuscular (126)

Los suelos de los bosques muestran una heterogeneidad espacial y temporal en la disponibilidad de nutrientes, particularmente de nitrógeno. Para acceder a ellos, los árboles han desarrollado esta estrategia simbiótica donde el micelio micorrícico se ensancha de tal manera que los hongos pueden explorar un volumen de suelo más grande que el accesible a la raíz. La ectomicorriza es por consiguiente ventajosa para la nutrición y el crecimiento de la planta (132). Las especies fúngicas implicadas son macromicetos que solamente estando en simbiosis pueden formar basidiomas, por ejemplo *Amanita*, *Boletus*, *Lactarius*, *Pisolithus* y *Suillus*, o ascomas como *Tuber*. Es poca la especificidad de estas asociaciones (61).

La estructura de la asociación entre un árbol y un basidiomiceto tiene tres componentes: un manto o vaina que encierra a la raíz, una red intrarradical de hifas en los espacios intercelulares y un sistema exterior de filamentos que se extiende por el suelo y forma las conexiones esenciales con los cuerpos frutíferos del hongo. La penetración intercelular y la formación de una red llamada de Hartig inducen a un profundo cambio en la morfología y metabolismo de las hifas.

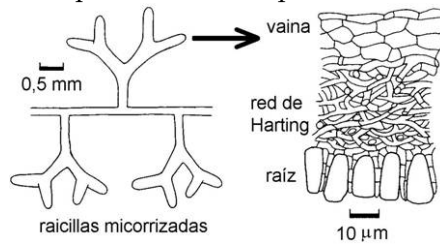


Figura 3.7. Micorrizas en pino (61)

La vaina ectomicorrícica permite el almacenamiento de nutrientes y controla el intercambio de los mismos por hidratos de carbono debido el contacto íntimo con la superficie de la raíz. Este intercambio responde a los cambios medioambientales, y elevados niveles de CO_2 aumentan el potencial de transferencia de la planta, mientras que un alto nivel de N mineral acrecienta el del hongo.

El micelio extrarradical que se extiende como hifas aisladas o largos cordones, conecta a la vaina con el suelo permitiendo por ejemplo, la incorporación de compuestos nitrogenados a considerables distancias del manto o movilizándolo desde el mantillo en un suelo forestal (132).