

# 3. Microbios del suelo

## 3.1. 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 oxígeno y comúnmente de diez a cien veces más CO<sub>2</sub> debido a la actividad biológica (1).

Un corte vertical del suelo revela un 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 microbios;

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 (2).

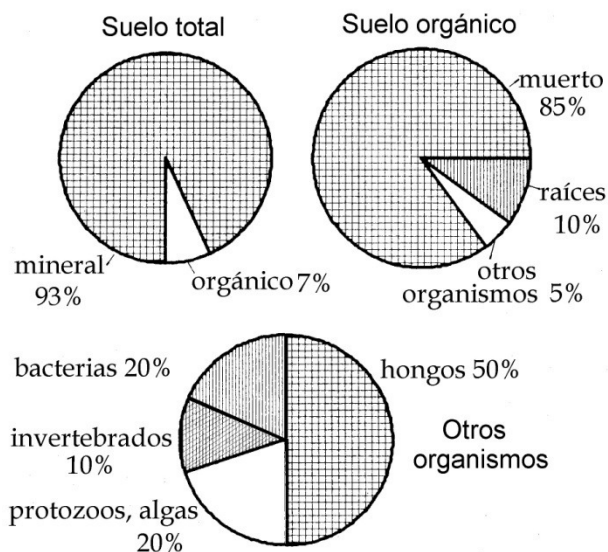
La textura del suelo depende de la cantidad de arena, limo, arcilla, y fracción coloidal. Arena es la porción de partículas con 0,05 – 2,0 mm de diámetro, limo las de 0,002-0,05 mm y arcilla aquellas menores a 0,002 mm. La fracción coloidal incluye materia orgánica e inorgánica. La proporción aproximada es 50, 20, 20, 3 y 5 %, respectivamente. Estos componentes se adhieren entre sí formando agregados porosos de tamaño variable (3).

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

El soporte orgánico y el mineral no son inertes. Los diversos procesos físicos, químicos y biológicos están íntimamente intrincados. Hay estabilización cuando los productos del metabolismo microbiano son sustraídos provisoriamente del proceso de biodegradación por adsorción sobre coloides (1).

La turba consiste en materia orgánica ligeramente descompuesta y acumulada bajo condiciones de humedad excesiva. El humus es la materia orgánica distinta de la turba y la biomasa del suelo. El ácido húmico es el material orgánico oscuro extraído del suelo por álcali diluido y precipitado con ácido, y el ácido fúlvico es el material orgánico amarillo remanente en la solución después de la acidificación (3).

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. Además, el suelo constituye un reservorio de organismos que se están domesticando con el fin de aumentar la productividad agrícola de una manera sustentable (1).



La mesofauna (lombrices, insectos, etc.) y microfauna (nematodos, rotíferos, etc.) intervienen en la depredación de microbios y protozoos, contribuyen a la descomposición de la materia orgánica aumentando la superficie expuesta a la acción de los microbios y mejoran la estructura del suelo. Tal es el caso de los nemátodos predadores, los escarabajos peloteros que entierran el estiércol y las lombrices que cavan galerías favoreciendo la ventilación del suelo y la filtración del agua (2).

Figura 3.1. Biomasa del suelo (4)

### 3.2. Diversidad microbiana

La palabra diversidad, cuando se usa en relación a los organismos de un ambiente, describe la complejidad y variabilidad a diferentes niveles: número y abundancia relativa de los taxones, variabilidad genética de los mismos, número y abundancia de los grupos funcionales. La medida de esta diversidad suele incluir múltiples métodos, tales como mediciones del total de la comunidad y aproximaciones parciales sobre ciertos grupos con atributos estructurales o funcionales específicos.

El simple recuento de los microbios del suelo presenta dificultades pues requiere cultivos, y no todos pueden ser multiplicados en el laboratorio, sea porque los requerimientos para el crecimiento son difíciles o imposibles de cumplir, o bien no se los conoce. Esto conduce a detectar apenas una parte ínfima de los organismos presentes. Suele usarse el análisis químico para determinar un componente característico que permita cuantificar la biomasa, tal como el ergosterol de los hongos. También han sido desarrollados métodos basados en sondas de ARN o ADN, y PCR para identificar organismos particulares en el ambiente natural.

Las bacterias y los hongos son los microorganismos dominantes en todos los suelos por su biomasa y actividad metabólica. Los efectos benéficos de las bacterias 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.

El rol de los hongos es diverso: contribuyen a la estructura del suelo, agregan partículas, penetran poros y fisuras de rocas y minerales, proceden a la invasión biomecánica de sustratos sólidos y el traslado de nutrientes inorgánicos y orgánicos, producen exopolímeros, intervienen en la retención y la migración de agua, forman cordones miceliares que favorecen el traslado de nutrientes, actúan como reservorio de nitrógeno y otros elementos, son responsables de la colonización o infección de plantas e insectos (5).

Los protozoos participan en el equilibrio biológico del suelo pues consumen grandes cantidades de bacterias, una ameba ingiere alrededor de 40.000 bacterias entre cada división celular. La población de flagelados y amebas en un suelo fértil es del orden de  $10^3$  a  $10^5$  / g, la de ciliados  $10^3$ /g y la de rizópodos testáceos  $10^3$  a  $10^4$ /g (2).

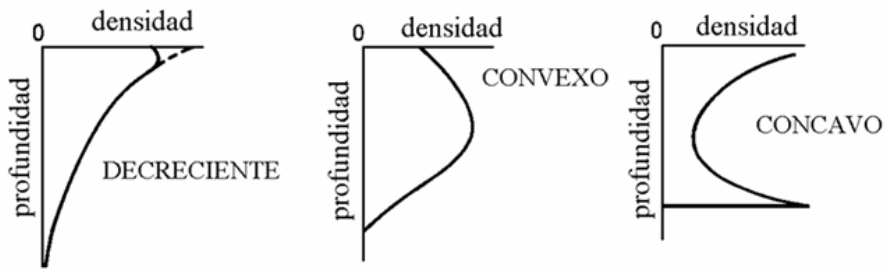
Comúnmente se asume que el carbono es el factor limitante del crecimiento microbiano en el suelo, aunque el nitrógeno y el fósforo también lo son. Es probable que distintas sustancias sean limitantes en diferentes suelos y que los factores puedan cambiar todo el tiempo, así como haber diferencias entre los factores que afectan a las actividades bacteriana y fúngica en el mismo suelo (6).

**Cuadro 3.1.** Distribución de los microbios en los horizontes de un suelo (7)

Profundidad cm	10 <sup>3</sup> organismos /g				
	Bacterias aeróbicas	Bacterias anaeróbicas	Actinobacterias	Hongos	Algas
3-8	7.800	1.950	2.080	119	25
20-25	1.800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	1	5	6	0,1
135-145	1	0,4	0	3	0

Los microorganismos 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.

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.



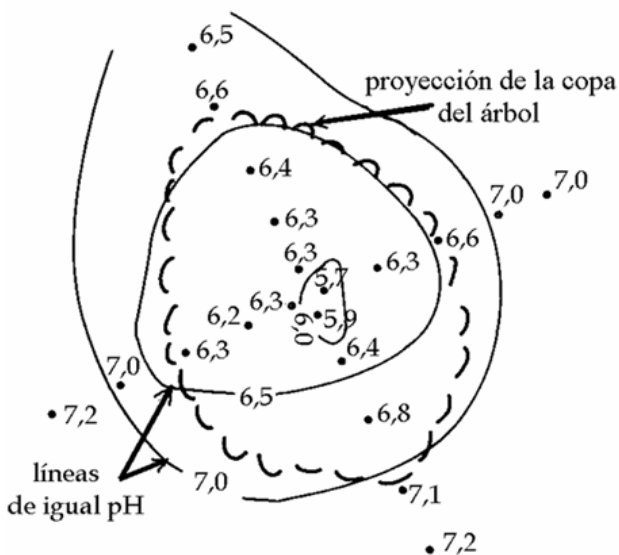
**Figura 3.2.** Tipos de distribución vertical de las bacterias en el suelo (8)

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 de 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.

En los suelos saturados de 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.



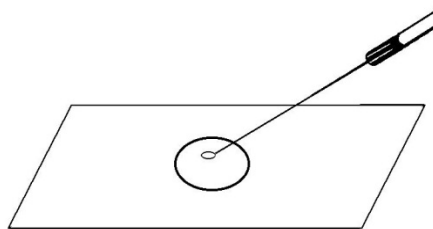
**Figura 3.3.** Acidificación del suelo debida al mantillo de *Pinus* (8)

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, como la acidificación producida por el mantillo de *Pinus* (8).

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 del suelo (9), habiéndose determinado que predominan *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ), *Acidobacteria* y *Bacteroidetes*. Sin embargo, mediante cultivos se encuentran *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*.

### Recuento microscópico directo

Marcar con un lápiz grueso, un círculo de 1 cm<sup>2</sup> sobre un portaobjetos. Depositar 0,01 mL con un asa calibrada de la dilución de suelo 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.



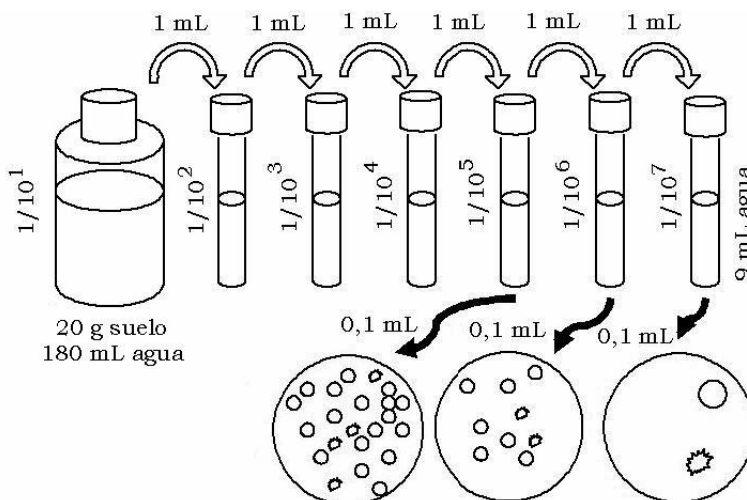
Contar las células de varias decenas de campos (de 0,02 mm<sup>2</sup> para la mayoría de los objetivos de inmersión). Dividir el número de microbios por el número de campos observados. Calcular el número de células correspondiente a un cm<sup>2</sup> o sea contenidas en el volumen depositado. Obtener el número/mL de dilución y multiplicar por la inversa de ésta para hallar el número total de microorganismos/g.

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

### Recuento de microorganismos viables

En un mortero, previamente desinfectado con alcohol, triturar 20 g de suelo y agregar poco a poco 180 mL de agua estéril. Trasvasar a un frasco estéril. Para hacer la diluciones pasar 1 mL al primero de una serie de tubos con 9 mL de agua estéril cada uno, mezclar en agitador vórtex y tomar 1 mL para volcarlo en el segundo tubo, y así hasta tener en el tubo sexto una dilución 1/10<sup>7</sup>. Usar una pipeta estéril para cada pasaje. Tomar 0,1 mL del último tubo y extender, con una varilla de vidrio en L flameada, sobre la placa de agar estándar, hacer lo mismo con los tubos penúltimo y ante-penúltimo. Incubar las placas con la tapa hacia abajo, en la estufa a 30°C durante 2 a 3 días.

Contar las colonias desarrolladas con ayuda de una lupa, comúnmente sólo se consideran las placas con 30 a 300 colonias. Calcular el número de colonias por mL de dilución y multiplicar por la inversa de ésta para referir el resultado a 1 g de suelo. Sacar el promedio de los valores obtenidos para hallar el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de bacterias heterotróficas por gramo de suelo.



Para el recuento de hongos y actinobacterias usar el agar malta-RB que contiene extracto de malta 20 g, fosfato dipotásico 0,5 g, rosa de Bengala 67 mg, agar 20 g, agua 1 L (sensible a la luz). Sembrar las diluciones 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-3</sup>, e incubar a 25-30°C durante 5 a 14 días dentro de bolsas plásticas. Los actinobacterias aparecen como pequeñas colonias rosadas a los 10-14 días.

Las muestras de suelo deben estar libres de restos vegetales y piedras, y se mantienen en el refrigerador o congelador dentro de bolsas plásticas el menor tiempo posible. Como agente dispersante, se suele agregar al agua de dilución ya estéril, pirofosfato de sodio en cantidad necesaria para alcanzar una concentración de 0,18% (13).

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*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*) (11). En cuanto a los actinobacterias, los géneros más abundantes son *Streptomyces* y *Nocardia*, con menos frecuencia se hallan *Micromonospora*, *Actinomyces* y otros (12).

Los géneros más representativos de mixobacterias del suelo son *Myxococcus*, *Chondrococcus*, *Archangium* y *Polyangium* (14). Entre las principales poblaciones fototróficas se encuentran las cianobacterias *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Plectonema*, *Schizothrix*, *Scytonema* y *Tolypothrix* (15)

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 (14). Las levaduras *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces* y *Rhodotorula* se encuentran en una amplia variedad de suelos (16).

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 (17).

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, o bien por el método de fumigación. Éste consiste en matar a los organismos con cloroformo, remover el fumigante, sembrar células vivas que descomponen la materia orgánica y valorar el CO<sub>2</sub> y el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> producidos con referencia a un testigo sin tratar (18).

### 3.3. Rizósfera

Las interacciones entre los vegetales y los microorganismos del suelo se manifiesta de modo especial en la 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) (3).

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 microbios que intervienen en la descomposición de los tejidos vegetales muertos (1). 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 (20).

#### Efecto rizosférico de un cultivo

Recoger la planta con el pan de suelo. Cortar la parte aérea y sacudir la raíz con suavidad. El suelo que continúa adherido se considera rizosférico. Colocar la raíz en un frasco estéril de peso conocido. Pesar y luego agregar 100 mL de agua estéril. Agitar durante 10 minutos. Retirar la raíz con una pinza, secarla y pesarla. Calcular, por diferencia, el peso del suelo rizosférico. Con la suspensión del suelo hacer las diluciones  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ .

Con el suelo no rizosférico preparar las diluciones  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ .

Inocular 0,1 mL de cada dilución en 3 placas de agar estándar y 3 placas de agar malta-RB. Incubar a 30°C durante 3 a 14 días, según corresponda. Observar y contar las colonias.

Calcular el efecto rizosférico dividiendo el número de ufc/g de suelo rizosférico por el número de ufc/g de suelo no rizosférico (19).

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 (21), o de algunos hongos micorrizantes que pueden alterar la composición de las poblaciones bacterianas por cambios fisiológicos de la planta hospedante o modificaciones en la composición de los exudados radicales (5).

**Cuadro 3.2.** Efecto rizosférico del trigo sobre varios grupos de microbios (8).

Grupo	Suelo 10 <sup>3</sup> ufc/g	Rizósfera 10 <sup>3</sup> ufc/g	Rizósfera/suelo	
Bacterias heterotróficas	52.700	1.121.000	21,3	
Hongos	120	1.160	9,7	
Protozoos	0,99	2,4	2,4	
Algas y cianobacterias	26,9	4,5	0,17	
Bacterias nitrificantes	100	100	1,0	
Bacterias esporuladas	575	927	1,6	
Bacterias celulolíticas	aeróbicas	2,7	720	267
	anaeróbicas	120	409	3,4
Otras bact. anaeróbicas	33	389	11,8	
Bacterias amonificantes	1.800	100.000	55,6	
Bacterias desnitrificantes	140	12.650	90,4	

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 CO<sub>2</sub> proveniente tanto de la planta (2/3) como de los microorganismos (1/3) (1).

**Cuadro 3.3.** Variación de la población microbiana a diferentes niveles de humedad (8)

Humedad del suelo %	% capacidad de campo	Bacterias 10 <sup>3</sup> /g	Humedad %	Hongos 10 <sup>3</sup> /g
6,5	30	9.980	8,9	99
10,0	50	11.890	11,2	89
16,1	65	16.410	18,5	142
17,4	70	29.960	24,2	149
21,4	100	25.280	27,1	173

La temperatura actúa directamente sobre los microorganismos del suelo no rizosférico como se observa en el cuadro 3.5, pero también indirectamente controlando los exudados radicales correspondientes a las temperaturas óptimas de crecimiento de las plantas consideradas, 30-32°C para soja y 13-16°C para trigo (8).

**Cuadro 3.4.** Influencia del anegamiento sobre los diferentes grupos bacterianos en la rizósfera de maíz cultivado en un suelo salino (8)

Grupos microbianos	Suelo a la capacidad de campo			Suelo anegado		
	Rizósfera 10 <sup>3</sup> ufc/g	Suelo 10 <sup>3</sup> ufc/g	Rizósfera /suelo	Rizósfera 10 <sup>3</sup> ufc/g	Suelo 10 <sup>3</sup> ufc/g	Rizósfera /suelo
Amonificantes	4.200	15	280	22.000	4.500	5
Sulfatorreductores	44	17	2,6	550	11	50
Fijadores N <sub>2</sub>	0,8	0,8	1	6	1	6

**Cuadro 3.5.** Influencia de la temperatura sobre la densidad microbiana en la rizósfera y el rizoplano de trigo y soja (8)

°C	Suelo no rizosférico	Trigo 10 <sup>6</sup> ufc/g			Soja 10 <sup>6</sup> ufc/g		
		Rizósfera	R/S	Rizoplano	Rizósfera	R/S	Rizoplano
13-16	78	1.165	14,9	308	186	2,4	28
21-24	120	710	5,9	150	230	1,9	62
30-32	167	266	1,6	147	3.570	21,4	138

R: rizósfera; S: suelo no rizosférico

### 3.4. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal

Se denomina microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR en las siglas inglesas) a la población microbiana 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 (22).



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, pues en la rizósfera de maíz predominan las  $\gamma$ -proteobacterias (*Enterobacter* spp.) seguidas por  $\beta$ -proteobacterias (*Burkholderia* spp.) (9).

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 hospedante excretando fitohormonas o sustancias que inhiben el crecimiento de los patógenos.

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal son inoculados a los suelos para mejorar la disponibilidad de nitrógeno, o en calidad de agentes de biocontrol que inhiben a los patógenos vegetales como *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., y *Rhizoctonia solani* entre otros.

Entre las bacterias pertenecientes a este grupo beneficioso se encuentran especies fijadoras de nitrógeno (*Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*) y productoras de antimicrobianos (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*) y fitohormonas (*Azospirillum*).

Numerosas actinobacterias son colonizadoras de las raíces y endófitos biológicamente activos, como *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora*, y *Nocardia* (22).

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 (5).

En las semillas se encuentran endófitos en número variable, desde 10 ufc/g en maíz hasta  $10^3$  a  $10^5$  ufc/g en algodón, pero la fuente más importante de organismos favorables es la rizósfera desde donde entran por fracturas en las raíces o degradación local de la celulosa (9).

La colonización de las semillas es crítica para controlar a los patógenos, tales como *Pythium*, que son atraídos por quimiotaxis y las infectan a las pocas horas después de plantadas (23).

Se suele adherir los microbios promotores a las semillas con ayuda de un aglutinante inerte, para que colonicen la rizósfera y según el éxito alcanzado en la instalación de estos organismos será el resultado observado en la planta. Las bacterias móviles tienen mayor probabilidad que sus competidoras inmóviles, aunque estas últimas pueden ser desplazadas por el agua que drena y el movimiento de las raíces o de otros organismos del suelo como los nemátodos (24).

Sin embargo, la supervivencia de los organismos promotores en la rizósfera es crucial porque la inoculación de las semillas no es factible en muchos

casos, tal el caso de ciertos árboles y plantas perennes o las propagadas vegetativamente (25).

*Trichoderma* es un hongo antagónico de algunos fitopatógenos del suelo que suele colonizar la rizósfera y el rizoplano (5).

Muchas cepas capaces de mejorar el crecimiento vegetal y la resistencia a las enfermedades en los ensayos en macetas, no son satisfactorias en el campo debido a la dificultad para manejar un ambiente tan complejo como es la rizósfera, donde la introducción de una mezcla de microbios no adaptados a un suelo y un cultivo determinados puede llegar a reducir la diversidad y los niveles de colonización de las poblaciones naturales (22).

Algunos materiales compostados empleados como abono del suelo o soporte de las plantas, protegen a éstas de los fitopatógenos porque estimulan la proliferación de los antagonistas en la rizósfera (26).

El uso intensivo de fertilizantes minerales cambia sustancialmente la composición de las poblaciones microbianas de un suelo y los agroquímicos no solo afectan a los patógenos y otros pobladores del suelo sino también a los endófitos de las raíces, directamente o a través de los cambios originados en la rizósfera (9).

#### 3.4.1. Productores de fitohormonas

En la rizósfera los microorganismos suelen originar sustancias que estimulan el desarrollo de las plantas (auxinas, citoquininas, giberelinas) en concentraciones muy bajas. Además de numerosos patógenos, varios microbios promotores producen ácido indolacético, como *Azospirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Pseudomonas putida* (27, 28, 29), y citoquininas, por ejemplo *Rhizobium*, *Azotobacter vinelandii* y *Methylobacterium* (30, 31).

Entre los hongos formadores de citoquininas se hallan *Agaricus*, *Boletus*, *Coprinus*, *Rhizopus* y *Suillus*, y de auxinas, especies de *Aspergillus*, *Boletus*, *Penicillium* y *Rhizopus* (32).

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* (33).

También unos pocas actinobacterias (*Streptomyces*) y bacterias (*Azospirillum brasiliense*, *A. lipoferum*) producen estas fitohormonas (34).

#### 3.4.2. Productores de antimicrobianos

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 (35).

*Pseudomonas fluorescens* forma los antibióticos aerugina, pirrolnitrina, pioluteorina y 2,4-diacetilfluorglucinol (28). También los lipopeptidos cíclicos (viscosinamida, tensina, anfisina) con propiedades antifúngicas y

biosurfactantes, estables en suelo estéril pero degradables por los microorganismos nativos de la rizósfera (36).

Otras especies de *Pseudomonas* producen fenazinas, ramnolipidos, azomicina, oomicina A, cepaciamida A, cepafungina y 2,3-deepoxi-2,3-didehidrorizoxina (28, 37). *Stenotrophomonas* sp., una bacteria de la rizósfera de remolacha azucarera, forma el lipopéptido cíclico xantobacina A (36). Las concentraciones de los antibióticos pirrolnitrina, 2,4-diacetilfluoroglucinol, pioluteorina y ácido fenazin-1-carbólico, observadas en suelo, suelen ser de 1; 0,94-1,36; 30-50 y 29-578 ng/g respectivamente (18).

En un suelo donde se suprimió a un determinado fitopatógeno la densidad de *Pseudomonas* productoras de 2,4-diacetilfluoroglucinol era 500 a 2.000 x 10<sup>3</sup> ufc/g de raíz mientras que en otros, en los cuales no se lograba controlaba la enfermedad, no se detectaban o su número era 40 veces menor (38).

*Bacillus subtilis* produce varios lipopéptidos cíclicos, entre ellos surfactina que es estable en el suelo, e iturin A que pronto desaparece debido a la lixiviación, degradación microbiana o adsorción por las partículas del suelo (36). *B. polymyxa* sintetiza el surfactante polimixina y *B. cereus* el antibiótico zwittermicin A (39, 40). 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 (18).

*Pantoea agglomerans* genera dos antibióticos, pantocina A y B (= herbicolina A y B), que contribuyen a su acción antagónica frente a la bacteria patógena *Erwinia amylovora* (41).

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 (42).

### 3.5. Bacterias de vida libre fijadoras de 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.

**Cuadro 3.6.** Algunos organismos de vida libre capaces de fijar N<sub>2</sub> en el suelo (43)

<b>Bacterias aeróbicas o facultativas</b>	Heterotróficas	<i>Azotobacter, Azomonas, Azospirillum lipoferum*</i> , <i>Bacillus polymyxa**</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Citrobacter freundii**</i> , <i>Klebsiella**</i> , <i>Mycobacterium flavum</i>
	Autotróficas	<i>Alcaligenes</i> , <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>
	Fototróficas	<i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i>
<b>Bacterias anaeróbicas</b>	Heterotróficas	<i>Clostridium</i> spp.
	Autotróficas	<i>Methanobacterium</i>
	Fototróficas	<i>Chromatium</i> , <i>Chlorobium</i> , <i>Heliobacterium</i>

\* microaerófilo, \*\* facultativo

### Aislamiento de bacterias diazotróficas del suelo

Inocular una placa de medio LG, con algunos gránulos de suelo o bien una suspensión del mismo, e incubar a 30°C durante 3-7 días. Las colonias blancas y húmedas de *Azotobacter chroococcum* aparecen a las 24 hs, pero después se tornan pardas, las de *A. vinelandii* y *Azomonas* spp. no se oscurecen. Las colonias de *A. paspali* con el centro amarillo por la acidificación, se observan a las 48 hs. Las colonias pequeñas y blancas de *Derxia gummosa* se ven rizadas, grandes y pardas después a una semana. Después sembrar una colonia por agotamiento en estrías sobre el mismo medio, e incubar a 30°C.

Medio LG: contiene sacarosa 20 g, fosfato dipotásico 50 mg, fosfato monopotásico 150 mg, cloruro de calcio 10 mg, sulfato de magnesio 200 mg, molibdato de sodio 2 mg, cloruro férrico 10 mg, azul de bromotimol 10 mg, carbonato de calcio 1 g, agar 15 g, agua 1L, pH 6,8.

Medio LG modificado para *Derxia*: contiene glucosa o almidón en vez de sacarosa (13).

La reducción del N<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> por ejemplo *Azotobacter vinelandii*, o la formación de células especiales (heterocistos) como ocurre en las cianobacterias.

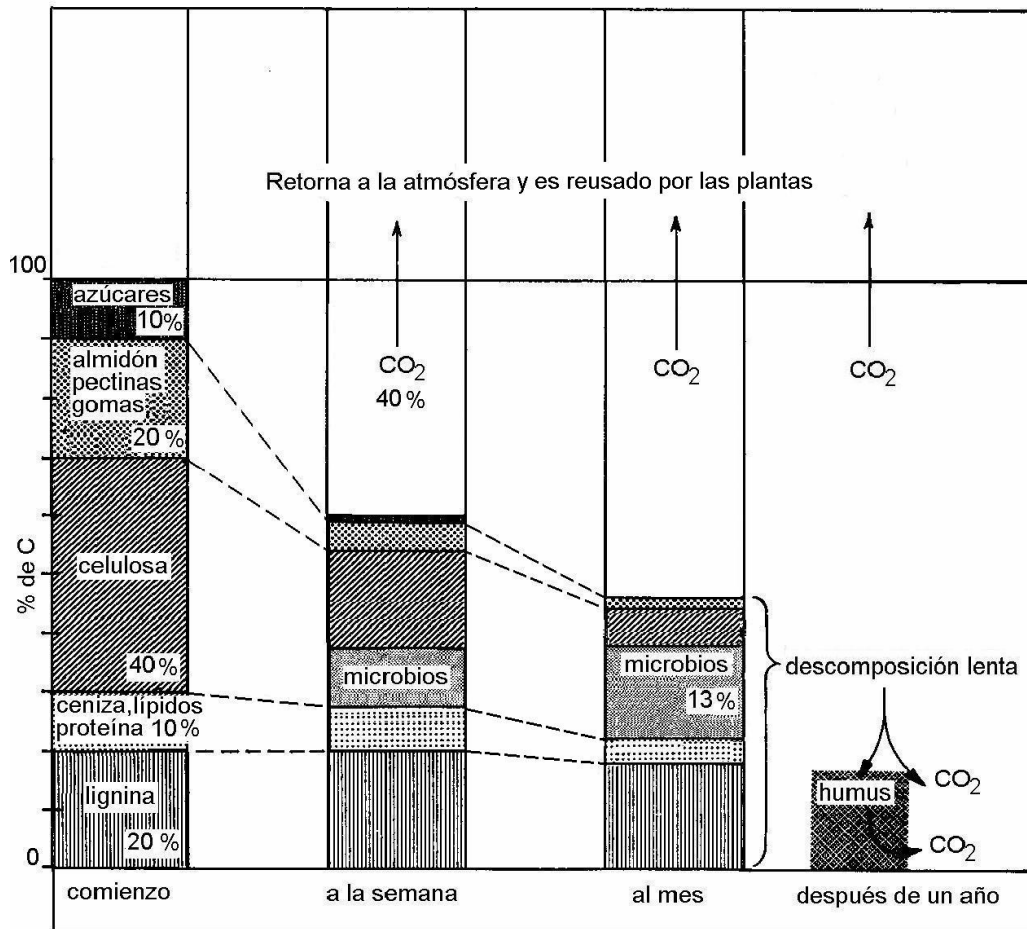
Los *Clostridium* diazotróficos proliferan en los microambientes anóxicos de los agregados del suelo o en consorcios donde los organismos facultativos consumen rápidamente el oxígeno por la respiración. La mayoría de los fijadores son mesofilicos pero *Streptomyces thermoautotrophicus* es activo hasta 75°C (43).

### 3.6. Degradación de biopolímeros

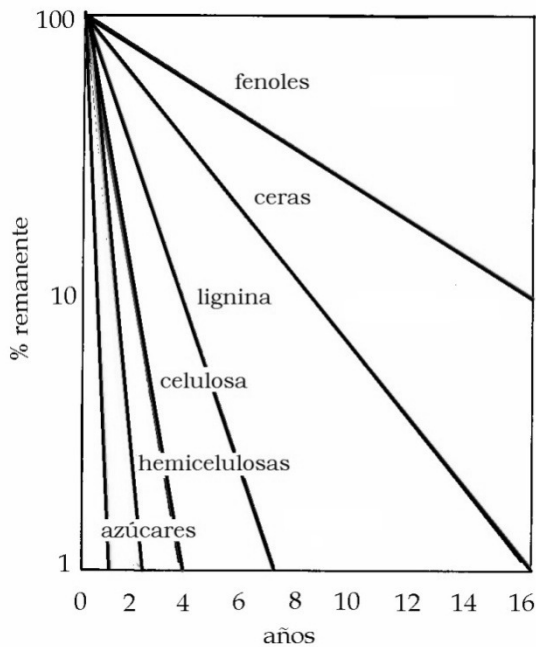
La mayor parte de la biomasa es descompuesta aeróbicamente por organismos invertebrados tales como gusanos, moluscos, insectos y sus larvas. Las enzimas extracelulares por lo común degradan los polímeros a moléculas asimilables.

Por otra parte, los microbios intervienen en los procesos degradativos del tracto digestivo animal transformando anaeróbicamente las sustancias fibrosas, tales como la celulosa, que constituyen una parte importante de la biomasa vegetal. Otros ecosistemas anóxicos habitados por microorganismos son los suelos inundados, silos, vertederos, ciénagas y sedimentos de aguas estancadas (44).

Los carbohidratos son los productos predominantes de la fotosíntesis vegetal y los principales nutrientes de la mayoría de los microorganismos en los ambientes naturales. Constituyen el 5 al 25% de la materia orgánica del suelo. Los restos vegetales proporcionan azúcares simples, hemicelulosas y celulosa, los que son descompuestos en distinto grado por bacterias, actinobacterias y hongos. Estos organismos a su vez sintetizan sus polisacáridos y otros carbohidratos que componen la mayor parte de los glúcidos hallados en el suelo (44).



**Figura 3.4.** Biodegradación del material vegetal en el suelo (10)



**Figura 3.5.** Velocidad de la degradación en el mantillo del suelo (1)

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en el interior de las células y constituyen más del 50% de su peso seco. Los polinucleótidos forman parte del núcleo celular y del citoplasma. Los diversos lípidos están en las membranas citoplasmáticas, las paredes celulares y los materiales de reserva de vegetales y microorganismos (43).

Muchos compuestos xenobióticos son agregados voluntariamente al suelo, o por accidente, y como tienen estructuras no reconocidas por la mayoría de las enzimas hidrolíticas son resistentes a la biodegradación (46).

Los azúcares simples son degradados en unos días y la lignina en varios años, mientras que las ceras, celulosa y hemicelulosas tienen una velocidad de transformación intermedia. El grado de descomposición varía según el ecosistema, así en los bosques tropicales el 40% de los detritos son mineralizados en un mes y en las zonas frías solo el 20% en un año (1).

Si la cantidad de nitrógeno presente es baja se debe incorporar estiércol, sales minerales o compuestos orgánicos para facilitar el crecimiento de las células microbianas involucradas en la biodegradación (10). La relación C/N de los restos vegetales no es suficiente para determinar la velocidad de transformación, debido a que las enzimas en algunos casos son inactivadas por formación de complejos tanino-proteínas y las sustancias húmicas del suelo son también una fuente de nitrógeno, aunque pobre (8).

### 3.6.1. Degradación de celulosa

La celulosa consta de unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosas reunidas por enlaces 1,4-glicosídicos y la molécula tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas. Su insolubilidad y alta resistencia mecánica se debe a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y a fuerzas de Van der Waals.

Los microorganismos que degradan la celulosa se encuentran íntimamente asociados a las largas fibrillas. La celulolisis es catalizada por tres enzimas, a veces llamadas en conjunto celulasas:

- endo- $\beta$ -1,4-glucanasa que ataca los enlaces  $\beta$ -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula dando largos fragmentos solubles (oligosacáridos),
- exo- $\beta$ -1,4-glucanasa que separa el disacárido celobiosa desde los extremos de la molécula,
- $\beta$ -glucosidasa que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa (4).

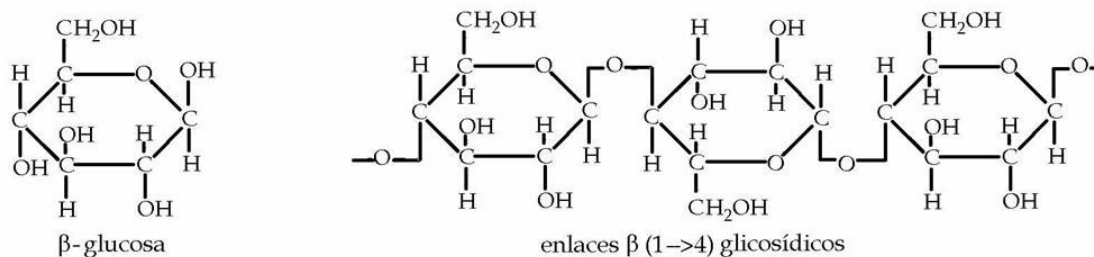
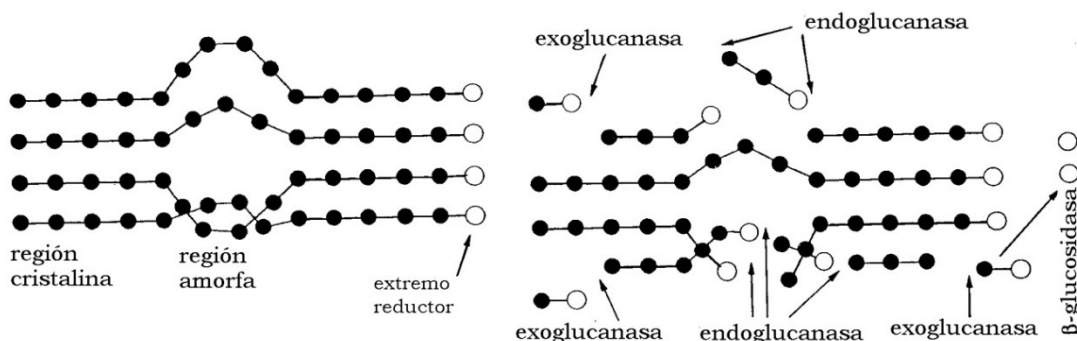


Figura 3.6. Esquema de la estructura de la celulosa y acción de las celulasas (47)



La hidrólisis de la celulosa intacta se cumple mejor cuando estas tres enzimas operan al unisono, como ocurre en el celulosoma de *Clostridium thermocellum* que se encuentra entre la célula y el sustrato. El celulosoma está constituido por varios sitios polipeptídicos de adhesión a la molécula de celulosa unidos al polipéptido sobresaliente de la capa S en la pared celular (45).

Los aportes de celulosa al suelo varían mucho con la región, el clima y los cultivos. En los suelos bien aireados la celulosa es degradada y utilizada por varios microorganismos aerobios. Muchos hongos son celulolíticos pero entre los microbios procarióticos esta propiedad está restringida a unos pocos grupos (bacterias deslizantes, clostridios y actinobacterias) (7).

Los organismos celulolíticos predominan en la rizósfera y su densidad decrece a cierta distancia de la planta. Por otra parte, la celulolisis es el proceso fundamental que ocurre durante el compostaje de los residuos agrícolas, donde predominan las especies termófilas. Los hongos tienen más éxito que las bacterias en la degradación que ocurre en los suelos ácidos (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*) o la madera (basidiomicetos), pues excretan celulasas. Éstas pueden ser aisladas del medio de cultivo fúngico, así como del micelio (46).

Las bacterias no excretan celulasas al medio, pero se adhieren a las fibras para digerirlas, y algunas producen una sustancia carotenoide amarilla que sirve como indicador de la hidrólisis. En los ambientes anaeróbicos la celulosa es degradada por bacterias meso y termofílicas, por ejemplo *Clostridium thermocellum* que tiene la particularidad de crecer en un medio mineral con celulosa pero no con glucosa.

El sistema natural más eficiente es el rumen donde el 90% de la celulosa es metabolizado bajo condiciones anaeróbicas por las bacterias, entre ellas *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, junto a *Neocallimastix* y otros hongos (4).

Los principales factores ambientales que afectan la descomposición de la celulosa en el suelo son el nivel de nitrógeno disponible, la temperatura, la aireación, la humedad, el pH, la presencia de otros glúcidos y la proporción de lignina en los restos vegetales.

En suelos con pH 6,5-7,5 se encuentra *Cellulomonas*, a pH 5,7-6,2 aún desarrolla *Cytophaga* y si la acidez desciende predominan los hongos, aunque suele haber algunas bacterias celulolíticas anaerobias aún a pH 4,3. Las actinobacterias se hallan en suelos muy diversos, entre pH 4,6 y 9,5. Por esto, al tratar un suelo con cal cambia la composición de la microbiota activa (7).

La celulolisis ocurre en un amplio rango de temperatura, de 5 a 65°C. Entre los organismos termófilos se encuentran los géneros *Clostridium*, *Streptomyces*, *Chaetomium*, *Humicola*, presentes en el estiércol y los vegetales en descomposición. Los microbios celulolíticos del suelo son principalmente mesófilos.

Una humedad por debajo del 50 al 60% de la capacidad de campo favorece a las formas filamentosas. En un suelo anegado la degradación se debe a las bacterias anaeróbicas. Las actinobacterias persisten a un 20% de la capacidad de campo pero no suelen ser activas.

La influencia de la salinidad está a veces enmascarada por otros factores. En el horizonte A de los suelos halomorfos hay mayor diversidad de microorganismos y en el B se hallan solo los halotolerantes por la acumulación de las sales (8).

#### **Microbios celulolíticos aerobios**

Mojar tiras de papel de filtro con la solución estéril de sales minerales y colocarlas en una caja de Petri. Distribuir una pequeña cantidad de suelo sobre las mismas e incubar a temperatura ambiente durante dos o tres semanas manteniendo la humedad. Sacar la tira de papel y colocarla en un portaobjetos para observar el ataque de las fibras bajo la lupa.

La solución de sales minerales contiene cloruro de amonio 300 mg, nitrato de sodio 500 mg, fosfato dipotásico 1 g, sulfato de magnesio 300 mg, cloruro de calcio 100 mg, sulfato ferroso 50 mg, agua corriente 1 L, pH 7 (13).

Las sustancias con las que está asociada la celulosa en los desechos vegetales influyen sobre la velocidad de la descomposición. La degradación de 30 g de celulosa, de los cuales 20 a 30% sirven para la síntesis microbiana, exige la provisión de 1 g de nitrógeno. Cuando la presencia de lignina hace más lenta la celulolisis, se requiere menos cantidad de nitrógeno porque éste es poco a poco reciclado (10).

Los nitratos favorecen la actividad celulolítica de algunos hongos del suelo, mientras que el amonio y los aminoácidos son mejor utilizados por las bacterias y los basidiomicetos. *Azotobacter* y otros organismos que fijan nitrógeno atmosférico junto a las bacterias solubilizadoras de fosfatos, favorecen la celulolisis. La aplicación de nitratos, amonio, urea y estiércol elevan la velocidad de la descomposición (7).

#### **3.6.2. Degradación de xilano y otras hemicelulosas**

Las hemicelulosas son polímeros de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) o ácidos urónicos (glucurónico, galacturónico) y la mayoría se encuentran asociados a la celulosa en las paredes vegetales.

El xilano es el polisacárido más abundante después de la celulosa. La corteza de los árboles y la paja contienen hasta 30% de xilano, la madera de coníferas 7 - 12% y la de árboles de hojas caducas 20 - 25%. La cadena consta de 30 - 100 unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosas con enlaces 1,4-glicosídicos. Algunos xilanos también presentan arabinosa, glucosa, galactosa y glucuronato en ramas laterales unidas al C<sub>3</sub> de la xilosa (4).

El xilano es degradado más rápidamente que la celulosa. La xilanasa que es constitutiva en algunos clostridios e inducible en otros organismos, produce xilosa, xilobiosa y oligómeros de 2 a 6 unidades. Muchos organismos excretan xilanasas y en los suelos neutros o alcalinos predominan *Bacillus*, *Sporocytophaga*, *Clostridium* y otras bacterias pero en los ácidos, los hongos. La temperatura óptima para la descomposición es 37°C, y para las actinobacterias termófilas entre 45 y 50°C.

Los mananos constituyen el 11% del peso seco de la madera de algunas coníferas. Son hidrolizados por muchos organismos que también actúan





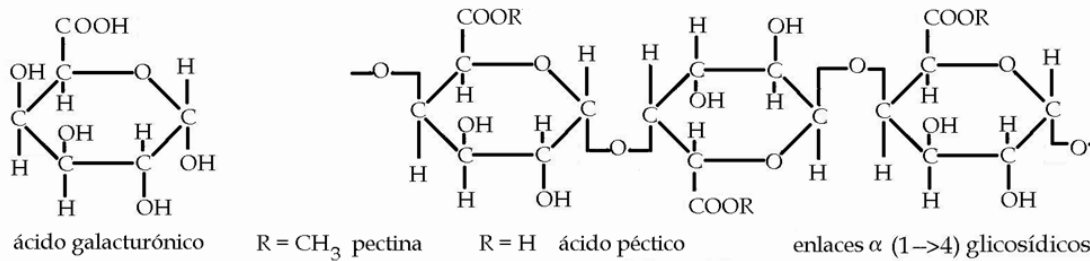


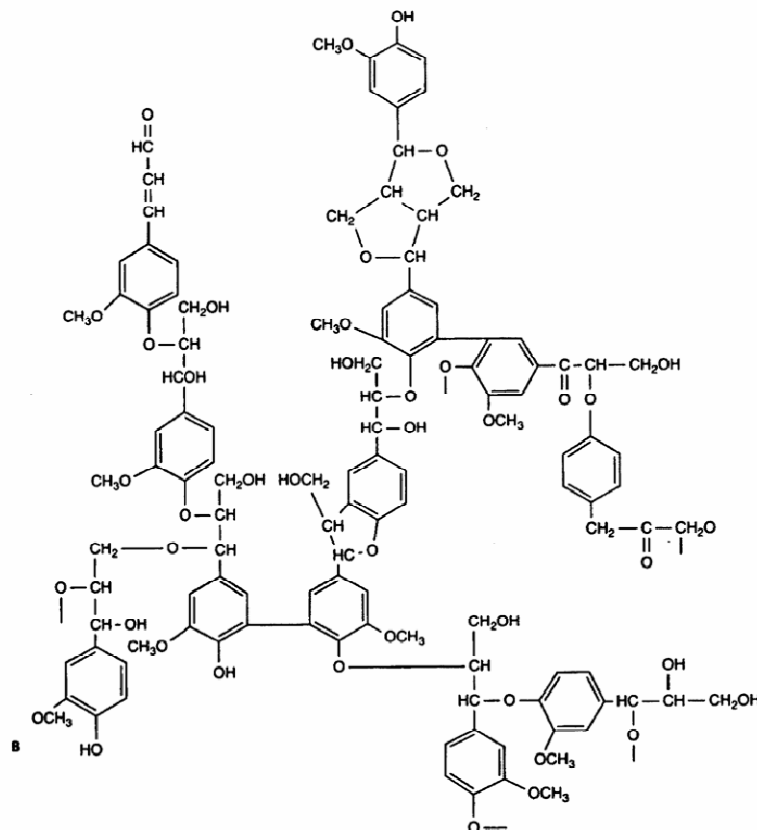
Figura 3.8. Pectinas

La degradación microbiológica de las pectinas es llevada a cabo por esterases y despolimerasas. La pectinesterasa hidroliza los ésteres y libera metanol. La poligalacturonasa hidroliza las uniones glicosídicas de los ácidos poligalacturónicos residuales (coloidales o solubles), produciendo monómeros y oligómeros del ácido D-galacturónico. La polimetilgalacturonasa hidroliza los enlaces glucosídicos de las pectinas (8).

Las enzimas que fragmentan las cadenas por transferencia de protones generando desoxiácidos (transeliminación) se denominan pectinliasa o pectatoliasa según actúen sobre pectinas o ácidos pécticos. Alrededor del 1-10% de los microorganismos del suelo hidrolizan las pectinas, estimulados por el sustrato (7).

La fitopatogenicidad de algunos microorganismos (*Pectinobacterium*, *Botrytis*, *Fusarium*) es debida a la capacidad de excretar "pectinasas". Los microorganismos que descomponen pectinas intervienen en el enriado de lino y cáñamo, liberando los haces de fibras de celulosa del tejido vegetal.

Los hongos intervienen en el proceso aerobio mientras en el anaerobio intervienen bacterias butíricas como *Clostridium pectinovorum* (4). Las bacterias anaeróbicas pectinolíticas son más abundantes en los suelos anegados y en los abonados con estiércol (8).



### 3.6.4. Degradación de lignina

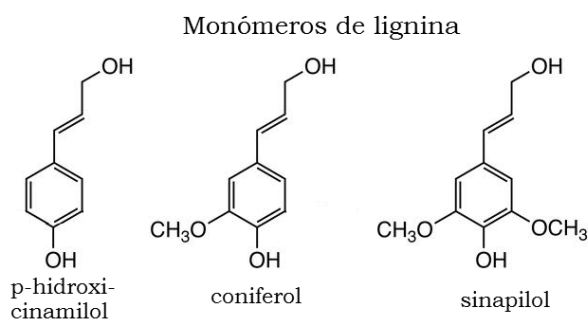
El contenido en lignina del tejido leñoso varía entre 18 y 30% del peso seco. Está ubicada en la lámina secundaria de las paredes celulares y es el componente de las plantas degradado más lentamente. No es químicamente uniforme y tiene una estructura muy compleja (7).

Figura 3.9. Esquema de la lignina (47)

Los monómeros son todos derivados del fenilpropano, principalmente el alcohol coniferilo. La complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros. Las diferencias en la composición de las ligninas se manifiestan en el contenido de grupos metoxi, por ejemplo 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto y 14% en gramíneas (4). Las unidades fenilpropano están entrecruzadas por múltiples enlaces éter y C-C, que son extremadamente resistentes al ataque enzimático. La lignina es un producto final inerte del metabolismo vegetal y solamente es degradada por microorganismos (8).

Se distinguen dos grupos de hongos entre los destructores de madera: los que causan la podredumbre parda que degradan celulosa y hemicelulosas dejando la lignina como residuo, y los que provocan la podredumbre blanca que degradan también lignina. Entre estos últimos se encuentran *Stereum*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Polyporus*, *Xylaria* (14).

La hidrólisis de la lignina ocurre en presencia de oxígeno y glucosa. El sistema enzimático contiene peroxidasas que catalizan la ruptura oxidativa de los enlaces  $\beta$ -O-4 éter y los C-C de la lignina y requieren  $H_2O_2$  proveniente de la oxidación por la glucosa-oxidasa. La formación de peroxidasas es promovida por la limitación de nitrógeno y la descomposición de la lignina por los microbios parece tener como principal objetivo el acceso a los componentes nitrogenados de la madera. Sobre los compuestos fenólicos de bajo peso molecular liberados actúan luego las fenoloxidasas (4).



**Figura 3.10.** (47)

Los polifenoles, como el catecol, son oxidados a quinonas, las que reaccionan con aminoácidos y otros compuestos aminados para formar los polímeros constituyentes del humus, que es la porción amorfa, coloidal y relativamente estable de la materia orgánica del suelo (2).

### Digestión de bagazo

Inocular el medio con micelio fúngico e incubar durante 2 a 6 semanas a 25°C. Si es necesario, agregar agua estéril para mantener el volumen. Filtrar por papel, secar en estufa a 105°C durante 24 horas y determinar la pérdida de peso.

Medio: Bagazo lavado y seco 10 g; extracto de malta al 2%, 50 ml (55).

### 3.6.5. Degradación del almidón

El almidón es el material de reserva que predomina en las plantas y comúnmente se presenta en gránulos con una típica estructura en capas. Está compuesto de dos glucanos: amilosa y amilopectina. La amilosa es soluble en agua caliente y se tiñe de azul con una solución acuosa de yodo.



del almidón, liberando maltosa mientras continúa el color frente al yodo. La hidrólisis se detiene en los puntos de ramificación de la amilopectina y el residuo se conoce como dextrina límite (43).

### Microbios amilolíticos

Sembrar la placa de medio estéril con la suspensión de suelo e incubar a 25-27°C. Después cubrir la superficie con solución acuosa de yodo (Lugol). La zona de hidrólisis alrededor del crecimiento microbiano aparece clara sobre un fondo azul.

El medio de cultivo contiene: almidón soluble 2 g, cloruro de amonio 300 mg, nitrato de sodio 500 mg, fosfato dipotásico 1 g, sulfato de magnesio 300 mg, cloruro de calcio 100 mg, sulfato ferroso 50 mg, agar 15 g, agua corriente 1 L, pH 7 (19).

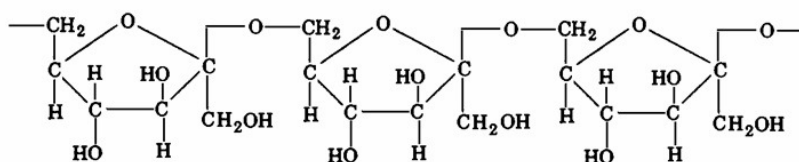
La pululanasa y la isoamilasa hidrolizan los enlaces 1,6- $\alpha$ -glicosídicos quitando las ramas de la amilopectina o las dextrinas. La glucoamilasa hidroliza la amilosa a glucosa. Si estas enzimas acompañan a las anteriores se logra una degradación total del almidón.

Las amilasas son inducibles, pero su producción depende del tipo de almidón empleado. Las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus stearothermophilus* y *B. licheniformis* son termoestables así como las excretadas por algunos clostridios termófilos, los que también forman pululanasas (4).

La actividad amilolítica varía a veces con el tipo de vegetación, la humedad y las características del suelo. El almidón es degradado por los clostridios fijadores de nitrógeno en los suelos anegados, a los que recientemente se incorporó material vegetal rico en polisacáridos de reserva (7).

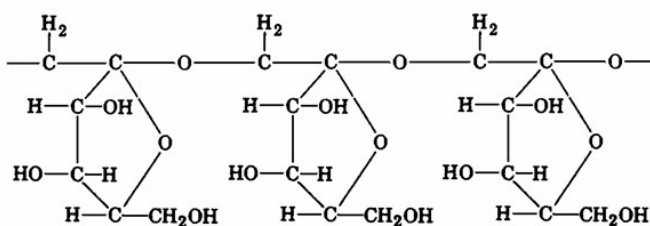
### 3.6.6. Degradación de levanos

Los levanos o fructosanos, son sustancias de reserva producidas por algunas plantas, por ejemplo la inulina de los tubérculos de dalia con enlaces  $\beta$ -2,1 glicosídicos, pero otros levanos tienen uniones  $\beta$ -2,6 glicosídicas. Los levanos constituyen el 12-15% del peso seco de algunas pasturas y son degradados por numerosas bacterias, actinobacterias y hongos (4).



levano de gramíneas

Figura 3.12. Levanos (fructosanos) (7)

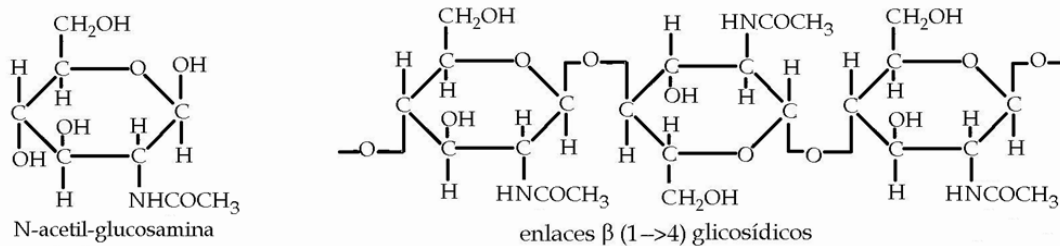


inulina

Algunos *Streptomyces*, organismos muy activos durante el compostaje, tienen una 2,6-fructosanasa que forma levanobiosa (fructobiosa) y ciertos hongos una 2,1-fructosanasa que origina oligómeros (7).

### 3.6.7. Degradación de quitina

La quitina le sigue a la celulosa en abundancia. Forma parte del exoesqueleto de artrópodos y de la pared celular de hongos filamentosos. Está constituida por unidades de N-acetil-glucosamina con enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos (43).

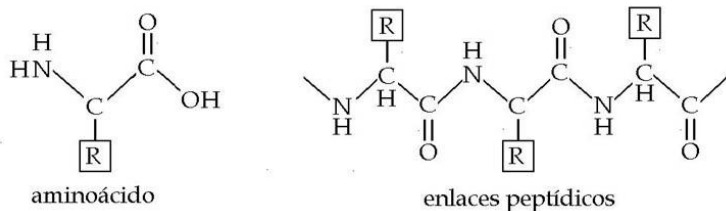


**Figura 3.13.**  
Quitina

La degradación por la quitinasa produce poca N-acetil-glucosamina y predominan los oligómeros (quitobiosa, quitotriosa). Los oligómeros son convertidos en monómero por la  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa. La quitin-desacetilasa transforma la quitina en quitosano y acetato por hidrólisis de los grupos acetamida (48). Un gran número de bacterias y actinobacterias pueden hidrolizar quitina. Entre los hongos con tal propiedad se encuentran *Mucor* y algunos *Aspergillus* (4). La síntesis de las quitinasas en las plantas es inducida por los agentes patógenos.

### 3.6.8. Degradación de proteínas

Las proteínas están constituidas por una o varias cadenas polipeptídicas donde los  $\alpha$ -aminoácidos están unidos por enlaces amida. Las proteínas conjugadas tienen además otros componentes como nucleótidos, lípidos, glúcidos, cationes metálicos o grupo hemo. Los catalizadores biológicos (enzimas) son también proteínas.



**Figura 3.14.** Esquema de un péptido

Antes que las proteínas puedan incorporarse a las rutas catabólicas deben experimentar hidrólisis completa hasta transformarse en aminoácidos, ya

que las moléculas proteicas intactas y la mayoría de los péptidos no pueden atravesar la membrana plasmática, mientras que los aminoácidos libres son absorbidos fácilmente (43).

Las proteinasas excretadas por los microbios producen aminoácidos y oligo-péptidos al hidrolizar las uniones peptídicas del interior de la cadena proteica y son muy específicas, pues hidrolizan sólo los enlaces formados por determinados aminoácidos. Los péptidos son hidrolizados por las exo- y endo-peptidasas. Las exopeptidasas se dividen en dos grupos: unas

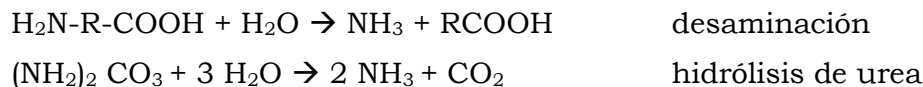
comienzan su acción por el enlace peptídico adyacente al grupo amino terminal y otras lo hacen por el cercano al carboxilo terminal (4).

Las proteínas de los organismos muertos son descompuestas por un gran número de hongos y bacterias. Las bacterias termofílicas producen proteinasas termoestables. Algunas proteinasas extracelulares actúan como toxinas, mientras que ciertos polipéptidos bacterianos son antibióticos. La degradación de proteínas en el suelo va seguida de la formación de amonio por la posterior descomposición de los aminoácidos (43).

### 3.6.9. Amonificación

El nitrógeno orgánico de los productos de hidrólisis de proteínas y polinucleótidos, se convierte en amoníaco por el proceso de desaminación. La urea se hidroliza rápidamente a amoníaco y dióxido de carbono por la enzima ureasa producida por muchos microorganismos. El amoníaco formado puede ser asimilado directamente por otros organismos o ser convertido en nitrato por las bacterias específicas. Si se añade a un suelo materiales tales como estiércol, aumenta en consecuencia la velocidad de nitrificación (44).

La evolución de la microbiota varía según la materia orgánica transformada, en general primero aparecen bacterias, luego actinobacterias y más tarde mohos. Comunmente los microorganismos productores de ureasa son *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium* y *Desulfotomaculum* (3).



#### Microbios amonificantes

Sembrar unos gránulos de suelo en un tubo con el medio estéril e incubar a 25-27°C. Después de una semana agregar 0,5 mL de reactivo de Nessler A y 0,5 mL del B, un color ladrillo indica la presencia de amoníaco.

El medio de cultivo contiene peptona 0,2 g, fosfato dipotásico 1 g, sulfato de magnesio 300 mg, cloruro de sodio 300 mg, cloruro de calcio 100 mg, sulfato ferroso 50 mg, agua corriente 1 L. El reactivo de Nessler consta de: A) Colocar en un mortero 5 g de ioduro mercuríco y 3,65 g de ioduro de potasio, añadir un poco de agua destilada y triturar hasta disolver. Completar a 100 mL con agua. B) Disolver 15 g de hidroxido de potasio en lentejas en 100 mL de agua (19).

### 3.6.10. Degradación de polinucleótidos

Los nucleótidos están formados por una base nitrogenada derivada de la purina o la pirimidina, una pentosa y ácido fosfórico. Son los monómeros de los polinucleótidos donde están unidos por puentes fosfodiéster. Los ácidos nucleicos son el 0,2-2,5% de los compuestos fosforados del suelo y su hidrólisis da oligonucleótidos y mononucleótidos con baja relación C/N (58). Los mononucleótidos a su vez son convertidos en nucleósidos (N-glicósidos de purinas o pirimidinas). Éstos son después hidrolizados en las

bases nitrogenadas y pentosas. Luego en el suelo el proceso continúa con la amonificación de las purinas y pirimidinas.

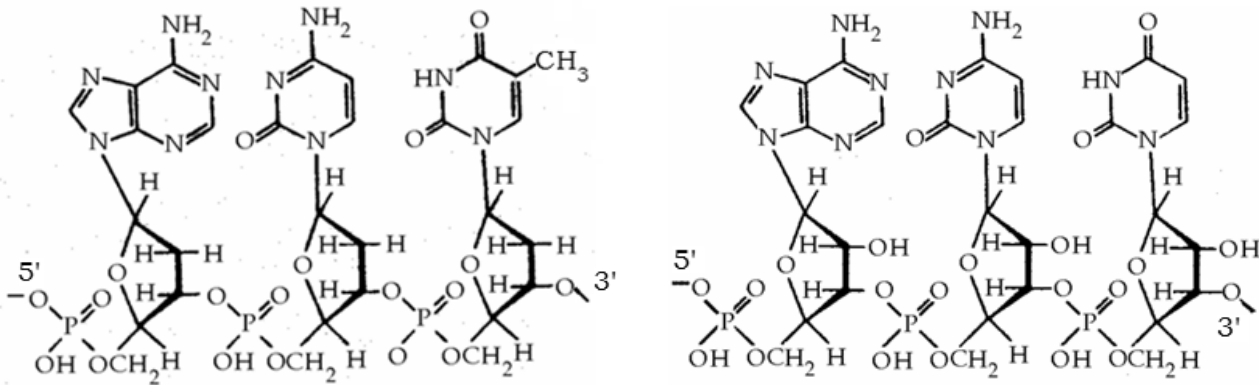


Figura 3.15. Esquema de poli-desoxiribonucleótido (izquierda) y poli-ribonucleótido (derecha) (49)

Las exonucleasas atacan solamente los extremos de las cadenas polinucleotídicas mientras que las endonucleasas hidrolizan enlaces de cualquier punto de las mismas. Las desoxi-ribonucleasas degradan el ADN y las ribonucleasas el ARN, aunque algunas fosfodiesterasas hidrolizan uniones de nucléotidos de ambos ácidos nucleicos. Entre los numerosos organismos que excretan nucleasas se encuentran algunos *Clostridium* (4).

### 3.6.11. Degradación de lípidos

Entre 1,2 y 6,3% de la materia orgánica del suelo se encuentra como grasas, ceras y resinas, aunque los valores pueden ser mayores en suelos forestales y turba. Los fosfolípidos constituyen el 1-5% de los compuestos fosforados del suelo y son de origen microbiano. La fracción hidrófoba de las gramíneas es de unos 2% de la materia seca, pero es más abundante en ciertos microorganismos que contienen más de 10%. Algunos de los componentes de los lípidos son fitotóxicos, mientras que otros (vitaminas) estimulan el crecimiento de varios organismos (44).

Numerosos microorganismos del suelo producen lipasas, capaces de hidrolizar los glicéridos dando glicerol y ácidos grasos, así como fosfolipasas. El catabolismo posterior de los ácidos grasos se lleva a cabo por una serie de  $\beta$ -oxidaciones que producen acetil-CoA, pero en el suelo esta degradación es lenta y limitada. Muchas levaduras de la filósfera degradan las ceras de la epidermis vegetal, también mohos tales como *Penicillium* y Mucorales, y algunas bacterias.

Por otra parte, ceras y materiales similares son los responsables de la condición hidrófuga de ciertas arenas. Numerosos microbios telúricos, entre ellos *Aspergillus* y *Penicillium*, sintetizan sustancias lipídicas que contribuyen a la estabilidad estructural del suelo (8). Los lodos de aguas residuales digeridas anaeróticamente, que suelen agregarse al suelo, contienen alrededor del 20% de grasas, aceites y ceras (44).





### 3.7. Compostaje

El compostaje es un proceso biodegradativo aeróbico de materiales orgánicos residuales en fase sólida, autocalentado por la generación metabólica de calor debida a bacterias, hongos, protozoos, nemátodos, lombrices y otros organismos. A nivel microbiano influyen varios factores interrelacionados, tal como la temperatura, la aireación, el contenido de agua y los nutrientes disponibles (51).

El objetivo primario es convertir un material inestable y potencialmente ofensivo en un producto final estable acompañado por la reducción del olor, la destrucción de patógenos y parásitos, la retención de nutrientes (3).

**Cuadro 3.7.** Contenido de nitrógeno de materiales residuales (base seca) (51)

Residuos	N total %	C/N	Residuos	N total %	C/N	
Estiércol	gallinas	6,3	...	Rastrojo soja	1,30	32
	ovejas	3,8	29	Rastrojo maíz	0,75	53
	cerdos	3,8	13	Paja	0,53	87
	caballos	2,3	24-25	Aserrín	0,1	511
	vacunos	1,7	18-25	Basura doméstica	2,2	25
Desperdicios de matadero	7-10	2	Heces humanas	5,5-6,5	6-10	

El proceso comienza con la recolección del material orgánico que contiene una población grande de hongos y bacterias. La paja o el bagazo, junto con el estiércol de cerdo, vaca y gallina, son algunas de las materias primas más adecuadas para la elaboración del compost. También se suelen agregar residuos procedentes de mataderos, rastrojo, podas o basura urbana.

La relación C/N no debe ser mayor de 30, pues un bajo contenido de nitrógeno no permite la formación de suficiente biomasa microbiana, pero un exceso de nitrógeno, por ejemplo C/N <10, causa la volatilización de amoníaco. Es conveniente que el rango de pH se encuentre entre 6 y 8, para el crecimiento óptimo de bacterias y actinobacterias. Si los residuos son ricos en ácidos orgánicos, debe añadirse 5% cal o piedra caliza (51).

El estiércol aporta fósforo, potasio y micronutrientes. La relación C/P es óptima entre 75 y 150, mientras que la relación N/P debe estar entre 5 y 20.

Los materiales tienen que ser cortados pues cuanto mayor sea la superficie expuesta, mayor será el ataque microbiano pero, las partículas demasiado pequeñas impactan negativamente en la aireación. Se distribuyen en capas superpuestas de 20 cm de grosor, entre las cuales se esparce el suplemento necesario y 1-2 cm de compuesto viejo a modo de inóculo. Cada capa se humedece bien. La altura de la pila suele alcanzar los 90. En la primera etapa se recubre todo con suelo o material vegetal seco (53).

El autocalentamiento debido a la actividad microbiana, eleva la temperatura interior hasta 55-60°C en dos o tres días y luego hay un

descenso gradual. El ecosistema del compuesto tiende a autolimitarse si hay una excesiva acumulación de calor con una transición brusca de una microbiota mesófila a una termófila.

En general la concentración de oxígeno dentro de la pila es unas cinco veces menor que en el aire y la ventilación se realiza por volteos periódicos. Una aireación insuficiente provoca un retardo en la descomposición, la formación de sulfuro de hidrógeno y la aparición de malos olores.

La remoción del montón produce un ascenso secundario de la temperatura ocasionada por el reaprovisionamiento de oxígeno. El contenido de agua debe mantenerse entre 50 y 70%, o sea el compuesto debe estar húmedo pero no empapado, porque un exceso interfiere con la aireación y reduce el autocalentamiento.

Para minimizar la duración del proceso se hacen remociones frecuentes manteniendo una buena aireación. El estado termogénico se prolonga hasta que la producción de calor es menor que la disipación.

Durante la fase final o de maduración, la cantidad de nutrientes fácilmente disponibles comienza a ser un factor limitante, causando una disminución de la actividad microbiana y el calor generado (52).

Diversos microorganismos mesófilos, termotolerantes y termófilos (bacterias, actinobacterias, levaduras, mohos y otros hongos) están activos durante los diferentes momentos del proceso, en función de su capacidad para degradar el sustrato y crecer a elevadas temperaturas. En la fase mesofílica se observan proteobacterias (*Pseudomonas*), Gram-positivas (*Bacillus*, *Lactobacillus*), actinobacterias y hongos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) (46).

Los microorganismos mesófilos mueren o están inactivos durante el estado termogénico inicial, en el cual aumenta el número y la variedad de los termotolerantes y termofílicos. La temperatura óptima de los hongos termofílicos está entre 40 y 55°C, con un máximo a 60-62°C, y por encima de estos valores solo perduran las esporas termotolerantes. Las bacterias termofílicas están activas a 50-60°C, pero a temperaturas mayores se reduce sensiblemente la diversidad (52).

En general durante una descomposición rápida y eficiente, la temperatura en la pila de compostaje no excede los 55-60°C, pero ocasionalmente suele alcanzar a 65 y 70°C con una gran variedad y alto número (entre  $10^7$  y  $10^{11}$  células/g peso seco) de bacterias aeróbicas capaces de crecer entre 60 y 82°C (51).

Los hongos frecuentes en los compost son *Mucor pusillus*, *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomium thermophile* y *Thermoascus aurantiacus*. Entre las bacterias termofílicas se encuentran *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermus* spp., *Streptomyces* spp., *Thermomonospora* spp., *Thermoactinomyces* spp. y *Clostridium thermocellum* (46).

Una aireación adicional puede mejorar el proceso, pero una temperatura mayor que 70°C puede causar la inactivación de los microorganismos y alargar o detener el proceso de compostaje. La etapa de enfriamiento está caracterizada por el crecimiento de una nueva comunidad microbiana mesofílica, distinta a la de la fase inicial, implicada en el reciclado de

nutrientes y la degradación de metabolitos microbianos tóxicos para las plantas (3).

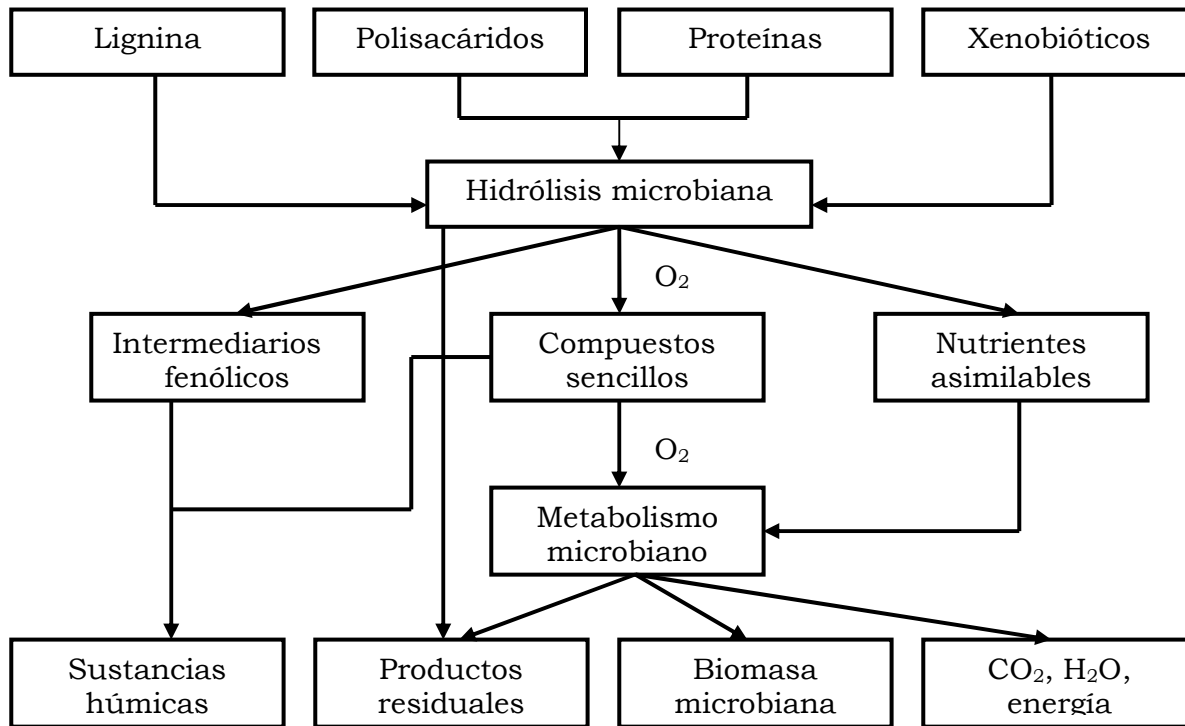


Figura 3.17. Reacciones bioquímicas básicas durante el compostaje (52)

El compuesto acabado suministra algunos nutrientes vegetales y antimicrobianos, y puede contribuir en el acondicionamiento del suelo y la eliminación de patógenos de las raíces. Se aplica para la regeneración de terrenos y en parques y jardines. La relación C/N de un compost maduro varía entre 10 y 20 según los residuos utilizados.

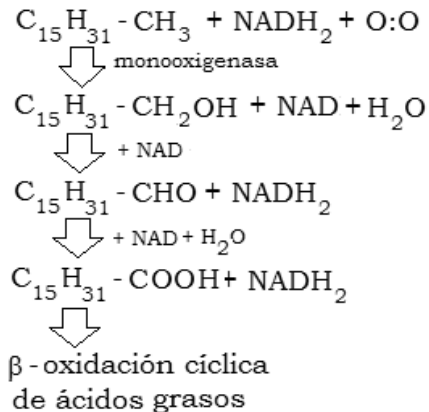
La eliminación de patógenos durante el compostaje es el resultado de varios factores: altas temperaturas, producción de antibióticos y otros antimicrobianos, actividad lítica de las enzimas (52).

El vermicompostaje permite reciclar los residuos orgánicos, tal como la basura doméstica. Los fragmentos de hortalizas y frutas de los desperdicios son degradados por bacterias y hongos, a su vez las lombrices consumen todo y con su motilidad aseguran la aireación y la mezcla del sustrato, pero un exceso de residuos suele producir condiciones anaeróbicas. La posterior descomposición microbiana de ese sustrato en el intestino de la lombriz conduce a la estabilización de la materia orgánica. Se ha observado que aproximadamente un kg de lombrices consumen 4 kg de residuos por semana en condiciones óptimas (3).

Las especies de lombrices utilizadas tienen un ciclo de vida corto y un crecimiento rápido. Entre ellas se encuentra *Eisenia foetida* que se desarrolla entre 5 y 25°C, con una humedad óptima de 80 a 85%, buena aireación y un pH de 5 a 9. En regiones tropicales se suele emplear *Eudrilus eugeniae* con una temperatura óptima de crecimiento de 25-30°C (56).

### 3.8. Biotransformación y biorremediación

La biodegradación es el proceso bioquímico en el cual los compuestos complejos son rotos en unidades más simples. La mineralización es la completa degradación de las sustancias orgánicas a CO<sub>2</sub>. En la biotransformación las moléculas orgánicas no cambian significativamente pues se reemplaza un grupo funcional, o se agrega otro, o hay oxidación/reducción de varios átomos de carbono (3).



La biorremediación es el uso de los microorganismos para eliminar contaminantes y puede reducir el riesgo de impactos adversos en el ambiente causados por compuestos tóxicos y peligrosos. Se lleva a cabo por dos caminos, la modificación ambiental como pueden ser la aplicación de nutrientes y la aireación, y el bioenriquecimiento que es la siembra de los organismos apropiados para la transformación de los xenobióticos (sustancias no halladas en la naturaleza) (46).

Figura 3.18. Oxidación de hidrocarburos alifáticos (3)

Un caso de biotransformación es la incorporación de un átomo de oxígeno a una molécula de hidrocarburo antes de su transporte y oxidación dentro de la célula microbiana. Si bien no hay una completa degradación las sustancias orgánicas tóxicas, un pequeño cambio puede disminuir la toxicidad.

Los hidrocarburos alifáticos son degradación rápidamente bajo condiciones aeróbicas. Los fenoles y ácidos aromáticos suelen ser degradados anaeróbicamente. Sin embargo, la modificación hidrocarburos alifáticos y aromáticos clorados es muy lenta y requiere como primer paso la eliminación del átomo de cloro. También hay compuestos que no son biodegradables (3).

Varios microorganismos (*Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acromobacter*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, y algunas levaduras) pueden utilizar los hidrocarburos en condiciones aeróbicas. Una especie de *Nitrosomonas* puede oxidar benceno. También algunas bacterias reductoras de sulfato pueden oxidar hidrocarburos y las reductoras de nitrato a su vez, degradar p-xileno (1).

La capacidad de los hongos lignívoros para atacar los compuestos fenólicos es aprovechada para remover cloroaromáticos contaminantes del agua o el suelo tales como el insecticida dicloro-difenil-triclorometano, el conservante pentaclorofenol, el herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético y el agente naranja ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (54).

Entre las bacterias usadas por su capacidad para degradar una gran diversidad de compuestos están *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Shewanella*. También se suele utilizar bacterias genéticamente modificadas con un catabolismo específico, pero la consecuencia de la liberación de estos organismos al ambiente suele ser incierta (46).

La intensidad de la degradación depende del tipo y la cantidad del contaminante, las condiciones locales y estacionales, y la composición de la comunidad microbiana autóctona. Si ésta puede degradar a la sustancia molesta no suele ser necesario añadir cultivos de microorganismos y la biorremediación se basa en el cambio de las condiciones ambientales para favorecer la actividad microbiana, como es el caso de suministrar oxígeno mediante el arado del suelo.

El mantenimiento de las condiciones aeróbicas es importante para la degradación de los hidrocarburos del petróleo. En otros casos las condiciones anóxicas favorecen la alteración requerida, así en la deshalogenación reductora. También hay procesos que necesitan la alternancia de condiciones aeróbicas y anaeróbicas como la transformación de los policloruros de bifenilo.

Además de la regulación del oxígeno y el control del pH se precisan nutrientes, en especial nitrógeno y fósforo, para mantener el crecimiento microbiano sobre los contaminantes. Diversas fórmulas fertilizantes, principalmente los abonos de difusión lenta, se emplean en distintas aplicaciones de la biorremediación de suelos y aguas contaminados.

La biodisponibilidad es fundamental para la degradación de ciertos xenobióticos en suelos y sedimentos porque estas sustancias suelen ser absorbidas y quedar secuestradas en las tramas arcillosas y dentro de los agregados húmicos inaccesibles a los microorganismos, o bien escindirse en otros contaminantes que forman una fase hidrófoba separada. A veces el empleo de biosurfactantes y/o agentes solubilizantes corrige el problema.

Cuando las poblaciones microbianas autóctonas no pueden degradar los contaminantes aun en condiciones ambientales favorables, se suele sembrar microorganismos con una capacidad metabólica específica. Este procedimiento es eficaz para la biorremediación de compuestos con múltiples sustituciones de cloro (18).

Algunos de los tratamientos se efectúan *in situ* pero otros se llevan a cabo *ex situ*, por ejemplo bombeando el agua contaminada hacia un reactor con un cultivo de microbios. La biorremediación se usa también para el tratamiento de algunos contaminantes del aire mediante filtros biológicos que permiten eliminar los malos olores cerca de granjas, en estaciones depuradoras de aguas residuales y en procesos industriales. Estos filtros contienen biopelículas de microbios que degradan a los contaminantes volátiles del aire (46).

---

## Referencias

1. Fenchel T *et al.* Bacterial Biogeochemistry. 2° ed, Academic Press, San Diego, 2000
2. Coyne M. Microbiología del Suelo. Paraninfo, Madrid, 2000
3. Ivanov V. Environmental Microbiology for Engineers. CRC Press, Boca Raton, 2011
4. Schlegel H.G. General microbiology. 7 ed. Cambridge University Press 1993
5. Gomes NCM *et al.* Applied and Environmental Microbiology 69: 3758, 2003
6. Alde'n L *et al.* Applied and Environmental Microbiology 67: 1830, 2001
7. Alexander M. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editor, México, 1980
8. Dommergues Y, Mangenot F. Écologie Microbienne du Sol. Masson et Cie, Paris, 1970
9. Seghers D *et al.* Applied and Environmental Microbiology 70: 1475, 2004.
10. Umbreit WW. Modern Microbiology. WH Freeman & Co., San Francisco, 1962
11. Yanagida F *et al.* Journal of General and Applied Microbiology 52: 21, 2006
12. Conn VM, Franco CMM. Applied and Environmental Microbiology 70: 6407, 2004

13. Alef K, Nannipieri P, eds. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Acad. Press, London, 1995
14. Carlile MJ *et al.* *The Fungi* 2° ed. San Diego, Academic Press, 2001
15. Marco SM de. *Lilloa* 38: 5, 1995
16. Azeredo LAI de, *et al.* *International Microbiology* 1: 205, 1998
17. Collins CH, *et al.* *Microbiological Methods*. 7° ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1999
18. Hurst J, ed. *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, 1997
19. Girard H, Rougieux R. *Técnicas de Microbiología Agrícola*. Acribia, Zaragoza, 1964
20. Kragelund L *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4920, 1997
21. Tokala RK *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2161, 2002
22. Conn VM, Franco CMM. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6407, 2004
23. Simon HM *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 67: 514, 2001
24. Knox OGG *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4666, 2004
25. Bashan Y *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1938, 1995
26. Brito Alvarez MA de *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 61: 194, 1995
27. Patten CL, Glick BR. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795, 2002
28. Lee JY *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2023, 2003.
29. Xie G *et al.* *Microbiological and Molecular Biology Reviews* 67 : 303, 2003
30. Bittinger MA, Handelsman J. *Journal of Bacteriology* 182: 1706, 2000
31. Koenig RL *et al.* *Journal of Bacteriology* 184: 1832, 2002.
32. Arora DK *et al.*, eds. *Handbook of Applied Mycology*, vol. 4. Marcel Dekker, New York, 1992
33. Hasan HAH. *Rostlinná Výroba* 48:101, 2002.
34. Cassan F *et al.* *Plant Physiology* 125: 2053, 2001.
35. Hansen LH *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 67: 239, 2001
36. Nielsen TH, Sørensen J. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 861, 2003
37. Johanson PM, Wright SAI. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6464, 2003
38. Raaijmakers JM *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 63: 881, 1997
39. Desai JD, Banat IM. *Microbiological and Molecular Biology Reviews* 61: 47, 1997
40. Stabb EV *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4404, 1994.
41. Wright SAI *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 67: 284, 2001
42. Davelos AL *et al.*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1051, 2004
43. Madigan TM *et al.* *Brock-Biology of Microorganisms*. 10° ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2003
44. Stevenson F.J. *Cycles of soil*. New York, John Wiley & Sons 1986
45. Shoham Y *et al.* *Trends in Microbiology* 7: 275-281, 1999
46. Atlas RM, Bartha R. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4° ed. Addison Wesley, Madrid, 2002
47. Webster J, Weber WS. *Introduction to Fungi*. 3°ed. Cambridge University Press, 2008
48. Ruiz Herrera J. *Investigación y Ciencia* 202: 42, 1993
49. Smith CA, Wood EJ. *Moléculas Biológicas*. Addison Wesley Longman, México, 1997.
50. Stanier RY *et al.* *Microbiología*. Barcelona, Reverté 1984
51. Rohlich G.A. *et al.* *Food, Fuel and Fertilizer from Organic Wastes*. National Academy Press, Washington, 1981.
52. Moreno Casco J, Moral Herrero R, eds. *Compostaje*. Mundi Prensa, Madrid, 2007.
53. Jagnow G, Dawid W, *Biotechnología*. Acribia, Zaragoza, 1991.
54. Anke & Weber. *Mycologist* 20: 83, 2006.
55. Gutierrez A *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1367, 1999
56. Dominguez J, Gómez-Brandon M. *Acta Zoológica Mexicana*, número especial 2: 309, 2010.





# 4. Interacciones

Las comunidades microbianas están caracterizadas por diferentes mecanismos biológicos:

- a) provisión de nutrientes específicos por los diferentes miembros de la comunidad,
- b) moderación de la inhibición del crecimiento,
- c) interacciones que alteran de los parámetros del desarrollo en las poblaciones individuales, produciendo un desempeño de la comunidad más eficiente y/o competitivo,
- d) actividad metabólica combinada no expresada por las poblaciones individuales aisladas,
- e) cometabolismo,
- f) reacciones de transferencia,
- g) interacción entre las especies dominantes.

La densidad de la población microbiana determina el tipo de interacción. Cuando es baja no hay interacciones positivas ni negativas, cuando es media los organismos compiten entre ellos por la disponibilidad de recursos, lo que altera la velocidad o eficiencia del crecimiento y la producción de metabolitos, afectando negativamente a los competidores. Cuando la densidad de la población es alta, por lo general, las células se aglomeran y cooperan entre ellas. La competición y la cooperación se deben a los cambios en el ambiente, tales como concentración de nutrientes, pH y potencial redox del medio, excreción de antibióticos o enzimas hidrolíticas extracelulares (1).

## 4.1. Tipos de Interacciones

### 4.1.1. 'Quorum sensing'

Los sistemas de control permiten a un organismo responder efectivamente a las señales de su ambiente, tal como la presencia de otros organismos de la misma especie. Ciertas bacterias poseen vías reguladoras que responden a la densidad de células dentro de la propia población. Este tipo de control se denomina 'quorum sensing'.

Cada bacteria Gram-negativa que posee tal sistema de regulación, sintetiza una enzima que difunde fuera de la célula. Solo se alcanza una alta concentración intracelular si las bacterias del entorno forman el mismo compuesto. Esta enzima es el inductor que se combina con una proteína activadora.

Este fenómeno fue observado por primera vez en bacterias luminiscentes. En otros microbios, como *Pseudomonas aeruginosa*, es una respuesta global cuando la densidad de la población es suficientemente alta, que lleva a la expresión de varios genes (2).

La patogénesis de la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* en animales implica la producción y excreción de numerosas proteínas, extracelulares y de la superficie celular, que dañan el tejido hospedante o interfieren con el sistema inmune. Los genes que codifican estos factores de virulencia están bajo el control de un sistema de quorum, el que responde a un péptido producido por el mismo microbio (3).

#### 4.1.2. Mutualismo

Los microorganismos que habitan en un ecosistema presentan varios tipos de asociaciones e interacciones entre las especies. A veces se reúnen diferentes especies bacterianas, o bien bacterias y otra clase de organismos (levaduras, mohos, algas, protozoos e incluso plantas), u hongos con plantas como en el caso de las micorrizas. En muchos casos, el crecimiento y la reproducción son más vigorosos en asociaciones favorables de dos tipos de microbios que en cultivos de una sola especie (4).

El mutualismo es la vida en común de dos o más organismos asociados en beneficio mutuo pero no implica necesariamente el contacto físico. En cambio, la simbiosis es una asociación específica entre dos tipos de organismos que están en contacto físico donde, por lo común, el de menor tamaño (simbionte) vive dentro o está adherido a la superficie del mayor (hospedante), pero la simbiosis no siempre implica mutualismo. El hospedante es un organismo eucariótico que mantiene al simbionte (eubacteria, actinobacteria, hongo o alga) intracelular o lo alberga en el interior de cavidades u órganos (5).

Las biopelículas que se forman en el forraje ingerido por el ganado vacuno y otros rumiantes, están inicialmente formadas por microorganismos que digieren la celulosa del material vegetal y producen ácidos grasos y otros metabolitos. Luego las células de especies diferentes invaden la película y comienzan a usar esas sustancias para su propio metabolismo. Así es como el forraje desaparece y es transformado en una masa bacteriana que el animal digiere más tarde. Estas películas son imprescindibles para los rumiantes.

Menos de la tercera parte de la biopelícula está constituida por microcolonias de bacterias, el resto es una sustancia blanda y pegajosa (matriz extracelular secretada por ellas) que absorbe agua, atrapa partículas pequeñas y mantiene unidas a las microcolonias. La película biológica está atravesada por diminutos conductos que bañan a cada agrupación bacteriana, aportando nutrientes disueltos y eliminando sustancias de desecho (6).

Otro caso de mutualismo obligado se lleva a cabo entre hormigas y un basidiomiceto específico (10). Las hormigas de la tribu Attini, géneros *Atta* y *Acromyrmex*, se caracterizan por ser cortadoras y recolectoras de material vegetal fresco y producir la degradación inicial del mismo antes de incorporar el hongo que cultivan, del cual se alimentan exclusivamente y sólo crece dentro de los hormigueros (11, 12).

Unas especies de *Atta* cultivan el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* que produce una estructura denominada gongilidio, rica en glicógeno y usada como alimento por las larvas de las hormigas podadoras (13).

Existen otros microorganismos que intervienen en este mutualismo complejo y son aprovechados por las hormigas para el cultivo y mantenimiento del hongo. En la cutícula de las hormigas jardineras crecen dos microorganismos: una actinobacteria (*Pseudonocardia*, *Streptomyces*) productora de antibióticos que ayudan en la defensa contra el moho *Escovopsis*, parásito de *Leucoagaricus*, y una levadura negra (*Cladophialophora*) (14, 15). Además, en esta compleja relación existen bacterias que fijan nitrógeno atmosférico, entre ellas las del género *Klebsiella*, y participan activamente en el cultivo de los hongos por las hormigas, dado el bajo contenido en ese elemento de las hojas utilizadas como sustrato (16).

#### 4.1.3. Comensalismo

Un organismo puede ser incapaz de multiplicarse en presencia de cierto sustrato, pero crecerá si coincide con un microbio capaz de degradarlo y producir moléculas útiles. Esta asociación es la vida en común de dos especies con beneficio para una de ellas y sin daño ni provecho para la otra, como ocurre cuando los microorganismos colonizan la superficie externa de una planta obteniendo energía de la metabolización de exudados producidos por ésta. Otro caso es la influencia favorable de una bacteria facultativa que reduce la cantidad de oxígeno del medio y crea un ambiente adecuado para que prospere una anaeróbica (1).

#### 4.1.4. Sinergismo y Sintrofia

Sinergismo es la asociación interactiva, aunque no obligatoria, entre dos poblaciones de la que ambas resultan beneficiadas, en cambio sintrofia (= cometabolismo) es la acción cooperante de dos microbios con metabolismos complementarios para alcanzar un efecto que no es logrado separadamente por ninguno de ellos (7). La degradación de los xenobióticos es llevada a cabo por diferentes grupos de organismos, los que producen la biodegradación no dependen de los productos y éstos son metabolizados por otros microbios (1). Una población mixta de *Nocardia* y *Pseudomonas* degrada el ciclohexano aunque estas bacterias no pueden hacerlo separadamente.

#### 4.1.5. Antagonismo

Un microorganismo puede producir metabolitos que alteren el ambiente desfavorablemente para el desarrollo de otros microbios o que perturben su metabolismo hasta el punto de que mueran o sean incapaces de reproducirse.

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas orgánicas relativamente pequeñas, producidas por unos organismos para inhibir a otros a una concentración muy baja y no suelen acumularse en los ambientes naturales. La mayoría de los productores de antibióticos se alojan en el suelo, donde abundan las poblaciones de *Streptomyces* y *Bacillus*.

Los antibióticos producidos en el suelo pueden unirse a las partículas de arcilla u otras y así quedar inactivados. Además muchas poblaciones microbianas son tolerantes a los mismos o pueden degradarlos (7).

Otras moléculas antagonistas son las bacteriocinas. Constituyen un grupo relativamente heterogéneo de péptidos o proteínas de bajo peso molecular. Actúan sobre la membrana de bacterias estrechamente relacionadas al agente productor causando la muerte de las células. Algunas bacteriocinas son: nisina producida por *Lactococcus lactis*, subtilina por *Bacillus subtilis*, pediocina por *Pediococcus acidilactici* (8).

#### 4.1.6. Depredación

La depredación es el ataque de un organismo a otro. Ocurre cuando el predador traga y digiere a la presa, como los protozoos, mixomicetos y algunos flagelados fototróficos que se alimentan de las bacterias.

Siempre que existan protozoos en estado activo, hay una población bacteriana que le sirve de presa. Una sola célula de protozoo consume entre dos etapas de división, de  $10^3$  a  $10^4$  bacterias, por lo que un suelo con  $10^3$  protozoos/g y  $10^9$  bacterias/g está caracterizado por una depredación activa.

Los protozoos no eliminan la población de sus presas porque esto acarrearía la desaparición consecuente del predador. Si hay una baja densidad de bacterias, el protozoo debe utilizar gran cantidad de energía para llegar a las pocas células que le sirven de alimento y morirá cuando se acaben, por lo que suele enquistarse (1).

Entre los hongos que capturan nemátodos se hallan *Arthrobotrys* y *Dactylaria*. Solamente en presencia de la presa forman los anillos de hifas constrictoras para la captura y los nemátodos inmovilizados son penetrados por las hifas (9).

#### 4.1.7. Parasitismo

Es la interacción entre organismos, donde el parásito obtiene sus nutrientes del hospedante. Todos los virus son parásitos de bacterias, hongos, algas, plantas y animales. Algunas bacterias son parásitas de procariotas, como es el caso de *Bdellovibrio* que parasita bacterias Gram-negativas (1).

Los patógenos biotróficos solo crecen y se multiplican en contacto con el hospedante (infección), mientras que los oportunistas y los saprobios pueden desarrollarse sobre materia orgánica muerta.

La interrelación entre un organismo patógeno y su hospedante en el desarrollo de la enfermedad está influenciada por la naturaleza de ambos, además de las condiciones ambientales predominantes.

Para que ocurra la enfermedad en una planta, el patógeno debe ser virulento y compatible con la misma. Algunos hongos conocidos como 'formae specialis' parasitan uno o muy pocos hospedantes. Los hongos producen un conjunto de enzimas que facilitan la infección y la colonización por degradación de los constituyentes celulares e intercelulares de las plantas. Hay especies patógenas que también liberan compuestos tóxicos dañinos para las células del hospedante (9).

Los virus, bacterias, hongos y protozoos cuando crecen en o sobre tejidos animales suelen causar enfermedad o sea se comportan como patógenos.

Los oportunistas se desarrollan sin producir daño, pero se convierten en patógenos de organismos debilitados o inmunocomprometidos (1).

#### 4.1.8. Biocontrol

Los métodos de control biológico aprovechan las relaciones existentes de antagonismo, depredación y parasitismo que normalmente atacan a las poblaciones de plagas. Para determinar la eficacia del uso de un agente de control biológico (insecto, bacteria, hongo) se deben analizar los posibles riesgos, pues su utilización está limitada por el daño posible en organismos ajenos a la plaga (7).

En el control biológico ejercido directa o indirectamente por bacterias u hongos sobre los agentes de las enfermedades de las plantas, algunos colonizan una parte del vegetal suprimiendo al patógeno por interferencia hifal, secreción de antimicrobianos o enzimas, tal el caso de *Bacillus subtilis* que excreta lipopéptidos tensoactivos. Otros excluyen al patógeno de un nicho particular (rizosfera, etc.) por sustitución competitiva o inducen los mecanismos de defensa del hospedante, así *Trichoderma* compite con *Verticillium* y *Fusarium* (9). El biocontrol de insectos se suele llevar a cabo, entre otros casos, mediante las toxinas de *Bacillus thuringiensis* o la acción de mohos, tal como *Hirsutella* (7).

## 4.2. Bacterias endotróficas fijadoras de nitrógeno

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*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (17).

La colonización de las raíces por *Azospirillum* (*A. lipoferum*, *A. brasiliense* y otros) no es específica y las bacterias migran entre diferentes especies de plantas. Se encuentran en el espacio intercelular del córtex radical dando lugar a una interrelación donde se benefician los dos participantes de la asociación. Este género se encuentra naturalmente en regiones tropicales y templadas, pero cuando se lo inocula en un suelo sobrevive con dificultad (18).

*Gluconoacetobacter diazotrophicus* fija nitrógeno en presencia de nitrato y excreta el 50% del amonio hacia su hospedante (caña de azúcar, café). Coloniza el rizoplasma y penetra a través de los sitios desde donde emergen las raíces laterales, llegando a los vasos del xilema (17).

Las especies de *Azoarcus* infectan las raíces de gramíneas fijando nitrógeno dentro de la planta. *Herbaspirillum seropedicae* coloniza la zona subepidérmica de las raíces de arroz, caña de azúcar, maíz, sorgo y otras gramíneas (19). *Burkholderia vietnamiensis* es una especie diazotrófica de amplia distribución geográfica, asociada a maíz y arroz (23). *Pseudomonas putida* es un diazótrofo que coloniza las raíces de colza a bajas temperaturas (20).

También se suelen observar consorcios endotróficos de bacterias anaeróbicas diazotróficas (*Clostridium pasteurianum*, *C. acetobutylicum*, *C. saccharolyticum*) con especies no diazotróficas (*Enterobacter* y otras) (21).

Otros ejemplos de asociación endofítica se observan en las cavidades de las hojas del helecho de agua *Azolla* que contienen a la cianobacteria *Anabaena azollae*, en las raíces aéreas de *Cycas* y *Gunnera* donde se halla *Nostoc*, y en el líquen *Peltigera* constituido por *Nostoc* y un hongo (22).

#### Aislamiento de bacterias endotróficas

Lavar la raíz para quitar el suelo adherido, cortar trozos y ponerlos durante 30 segundos en etanol 95% y luego sumergir en lavandina concentrada diluida al 1/10 durante 3 a 6 minutos. Lavar tres o cuatro veces, agitando enérgicamente, en sendos tubos de agua estéril. Transferir los trozos con una pinza cuyas puntas fueron previamente mojadas en alcohol y flameadas.

Moler 10 g en un mortero con arena estéril, suspender con 90 mL de agua estéril, dejar decantar y hacer diluciones desde  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ . Inocular en tubos con el medio semisólido NFb. Incubar a 30°C. *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp. forman una película superficial. Sembrar por agotamiento en estría sobre agar papa málico e incubar a 30°C.

El medio semisólido NFb contiene: ácido málico 5 g, fosfato dipotásico 1,5 g, sulfato de magnesio 200 mg, cloruro de calcio 20 mg, solución de micronutrientes 2 mL, extracto de levadura 20 mg, cloruro férrico 10 mg, azul de bromotimol 10 mg, agar 2 g, agua 1 L, pH 6,8.

La solución de micronutrientes contiene sulfato cúprico 40 mg, sulfato de zinc 12 mg, ácido bórico 140 mg, molibdato de sodio 100 mg, sulfato de manganeso 150 mg, agua 100 mL.

El agar papa málico contiene caldo de papas 200 mL, ácido málico 2,5 g, sacarosa 2,5 g, agar 15 g, agua 800 mL, pH 6,8. El caldo de papas contiene papas cortadas en cubos 200 g, agua 1 L; hervir durante 30 minutos y filtrar por algodón (24).

### 4.3. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno

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 una actinobacteria (*Frankia*) que forma actinorrizas en plantas de otras familias (25,26).

#### 4.3.1. Rizobios

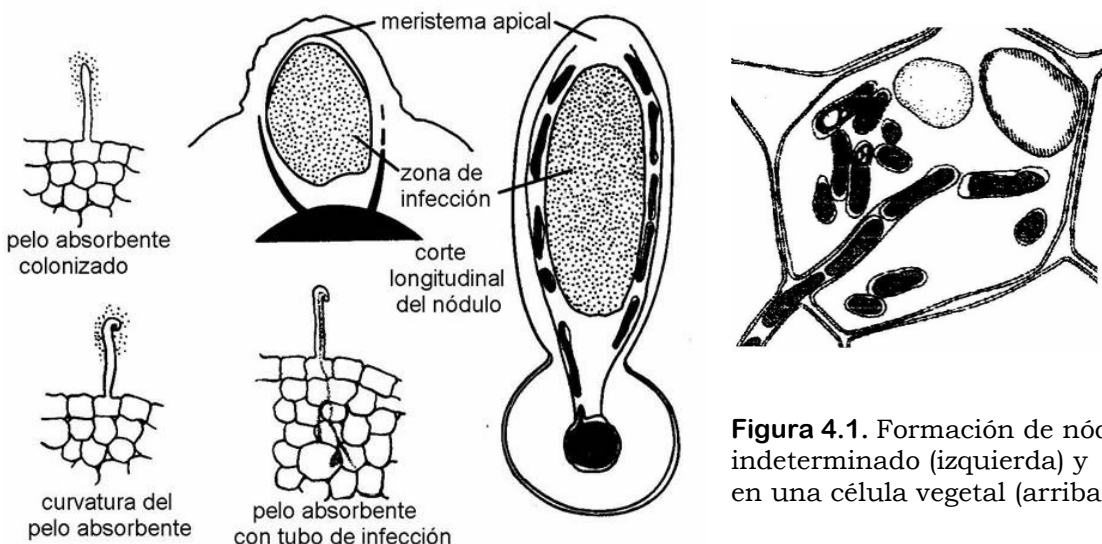
Una particularidad de las plantas leguminosas es su capacidad para asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* y otros relacionados. Esta simbiosis se manifiesta por el desarrollo del nódulo en cuyo interior se multiplican las bacterias y transforman el nitrógeno del aire en amonio. La asimilación de ese amonio por parte de las plantas les permite crecer en suelos pobres en nitrógeno (22).

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 (27).

Los grupos de genes esenciales para la nodulación son: a) los implicados en la formación de la pared celular bacteriana que determinan la síntesis de exo liposacáridos, b) 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 hospedante. 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 (28).

Cuando los pelos radicales jóvenes se han doblado lo suficiente como para atrapar al rizobio en un bolsillo de pared celular del hospedante, ésta es hidrolizada y 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 (28).



**Figura 4.1.** Formación de nódulo indeterminado (izquierda) y bacteroides en una célula vegetal (arriba) (29)

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 (30).

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 (28).

**Cuadro 4.1.** Plantas hospedantes de varios géneros de rizobios (17, 28, 31)

Rizobios	Plantas hospedantes	
<i>Allorhizobium undicola</i>	<i>Medicago sativa</i> , <i>Acacia</i> spp., <i>Lotus arabicus</i> , <i>Neptunia natans</i>	
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> spp. (nódulos del tallo)	
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> , y otras legumbres	
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> , y otras legumbres	
<i>B. yuanningense</i>	<i>Lespedeza cuneata</i>	
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	
<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.	
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i> , <i>G. orientalis</i>	
<i>R. leguminosarum</i>	bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> spp.
	bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> spp., <i>Macroptilium</i> spp.	
<i>Sinorhizobium</i> sp.	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	
<i>S. fredii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> , y otras legumbres	
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i> spp.	
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Parasponia</i> spp. (no legumbre)	

Para que los nódulos de las leguminosas fijen nitrógeno es imprescindible que contengan leghemoglobina cuyo grupo hemo es sintetizado por el vegetal (32). 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 O<sub>2</sub> 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 (3).



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 (33).

### **Examen de nódulos**

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 (34).

### **Aislamiento de rizobios**

Lavar la raíz para quitar el suelo adherido. Elegir los nodulos de mayor tamaño, separarlos y colocarlos en un tubo o frasquito. Lavarlos nuevamente, agitando con fuerza para eliminar la mayor parte de los residuos. Poner los nodulos durante 30 segundos en etanol 95% y luego sumergir en lavandina concentrada diluida al 1/10 durante 3 a 6 minutos. Lavar tres o cuatro veces, agitando enérgicamente, en sendos tubos de agua estéril. Transferir los nodulos con una pinza cuyas puntas fueron previamente mojadas en alcohol y flameadas.

Tomar un nódulo y aplastarlo entre dos portaobjetos previamente flameados. Tomar con el asa parte del contenido y hacer una serie de estrías sobre la placa de agar papa levadura. Incubar 4 o 5 días a 28-30°C. Elegir una colonia y repicar en tubos con el mismo medio. Las colonias de *R. meliloti* son convexas, circulares, blancas, de 2-5 mm diam., las de *R. trifolii* con frecuencia son gomosas.

Agar papa levadura: caldo de papas 200 mL, glucosa 10 g, agar 20 g, extracto de levaduras 2,5 g, agua 1 L; pH 7,0.

Caldo de papas: cortar en cubos 200 g de papas, agregar 200 mL de agua, calentar en autoclave a 110°C durante 15 minutos, filtrar por gasa y algodón (35).

En algunas plantas, por ejemplo maní, la presencia del rizobio induce la emergencia de una raíz lateral que al crecer causa la separación de las células corticales y epidérmicas, permitiendo la entrada del microsimbionte y su diseminación intercelular. La continua división de las células del hospedante lleva al desarrollo de un tejido central infectado uniformemente, a semejanza de un nódulo determinado (28).

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

La inoculación con rizobios resulta imprescindible cuando se introducen nuevas leguminosas, sobre todo si son hospedantes de alta especificidad o cuando la deficiencia en nitrógeno limita el desarrollo vegetal. El método y las condiciones de inoculación deben permitir la supervivencia de los

rizobios, y favorecer la colonización de la rizósfera por la bacteria, para lograr la formación de los nódulos y su funcionamiento efectivo.

La inoculación puede resultar inútil si las leguminosas nodulan eficientemente con las cepas nativas. Pero en muchos suelos el nivel y la eficiencia de éstas suelen no ser adecuados, y la nodulación y la fijación de nitrógeno consecuente resultan insuficientes para satisfacer las demandas del cultivo.

La cepa seleccionada debe ser genéticamente estable, tener una alta competencia frente a las cepas menos eficientes propias del suelo, crecer en los medios corrientemente utilizados en la industria y sobrevivir en el soporte a las condiciones de comercialización (36).

### Ensayo de inoculación

Colocar semillas de alfalfa de buen poder germinativo, en un matraz de Erlenmeyer con etanol al 70% v/v y agitar durante 3 a 5 minutos. Volcar y añadir agua lavandina al 10% v/v, agitando por igual tiempo. Lavar con agua destilada estéril. Depositarlas en cajas estériles sobre papel humedecido con agua y dejar germinar durante 4-5 días.

Colocar unos 6 cm de arena amarilla en 4 tubos de 3 x 20 cm, con tapón de algodón, y humedecer ligeramente. Agregar 0,4 mL de solución mineral y 0,12 mL de solución de fosfatos a cada uno, y en el tubo IV añadir 0,1 g de nitrato de amonio.

Suspender el cultivo en tubo de rizobio aislado con 2 mL de una solución estéril de sacarosa al 0,1%. Hacer lo mismo con un cultivo puro de *R. meliloti* o *R. trifolii*.

Esterilizar con alcohol una varilla de vidrio y hacer pocitos de unos 2 cm de hondo en cada tubo. Con una pinza esterilizada con alcohol, transferir las plántulas a los tubos. Inocular el tubo I con 1 ó 2 gotas de la suspensión de la cepa aislada y el II con la del cultivo conocido. Añadir 1 ó 2 gotas de la solución de sacarosa al tubo IV. Con la varilla estéril cubrir las radículas con arena.

Dejar las gradillas a la luz durante 5 semanas, controlando la humedad del sustrato.

Retirar las plantas y lavar las raíces con cuidado. Observar la ubicación, tamaño y forma de los nódulos. La planta del tubo IV crecerá normalmente, las de los tubos I y II deberán presentar nódulos y la del 3 morirá por falta de nitrógeno.

La solución mineral contiene sulfato de potasio 4 g, sulfato de zinc 0,3 g, sulfato de cobre 0,15 g, molibdato de sodio 0,5 mg, agua destilada 100 mL.

La solución de fosfatos contiene fosfato diácido de calcio 8 g, ácido fosfórico 25 mL, fosfato diácido de sodio 10 g, agua destilada 100 mL, neutralizada a pH 6,0.

La arena amarilla aportará hierro y otros micronutrientes (35).

La eficiencia de la fijación se evalúa por el número de nódulos, la masa nodular, el peso seco de la planta y el contenido de nitrógeno de la parte aérea. Son bacterias efectivas las que aportan suficiente amonio al hospedante para promover un aumento de peso del mismo.

Para determinar la necesidad de inoculación se suele emplear un ensayo simple de tres tratamientos:

1. inoculación con una cepa de rizobio conocida para saber si es efectiva en el hospedante,
2. fertilización para asegurar un buen desarrollo del hospedante si no hay inhibidores en el suelo,
3. control no inoculado para observar la presencia o ausencia de rizobios nativos y su efectividad.

Un inoculante para enriquecer el suelo con la bacteria simbiótica deseada, contiene altas concentraciones celulares en un sustrato que favorece largos periodos de supervivencia sin pérdidas de las características fisiológicas del microorganismo.

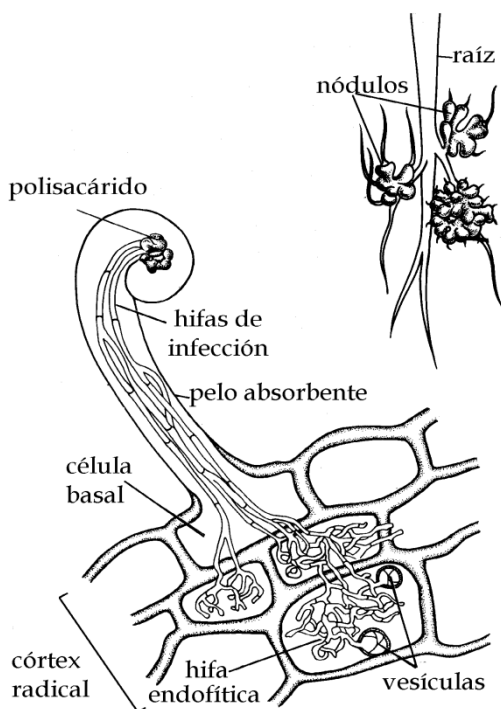
Los pasos a seguir en su elaboración comprenden:

- a) seleccionar las cepas convenientes por su mayor eficiencia;
- b) cultivar del microorganismo en un medio líquido;
- c) elegir, preparar y esterilizar el material de soporte;
- d) impregnar del soporte con el cultivo que posee un alto número de células,
- e) controlar del número de bacterias vivas en el producto terminado.

El empleo de turba estéril como soporte, el almacenamiento refrigerado del producto y el control de calidad, permiten mantener altos niveles de rizobios vivos en la distribución del inoculante. Esto se traduce en un incremento de rizobios por semilla. Se suele exigir  $2 \cdot 10^9$  bacterias/g de inoculante a la salida de la fábrica, para así asegurar que el momento de aplicación permanezcan vivos en número suficiente, también las condiciones de transporte, almacenamiento y uso determinan el éxito de la inoculación (36).

#### 4.3.2. Actinobacterias

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 (32).



Algunos árboles, como alisos y casuarinas, forman los nódulos les proporcionan entre 70 y 90% del nitrógeno total necesario. Crecen en suelos empobrecidos 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.

**Figura 4.2.** Nódulos de *Frankia* (22)

De esta manera pueden establecerse el 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.

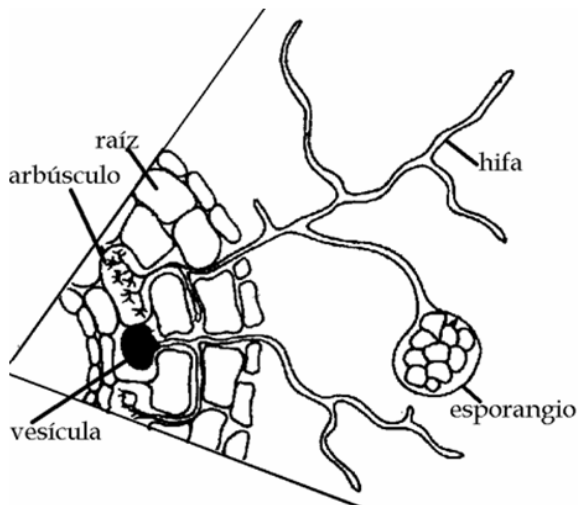
La población de la actinobacteria puede mantenerse activa en el suelo por la presencia de vegetación que favorece su crecimiento saprofítico pues coloniza la superficie radical obteniendo nutrientes de los exudados y sigue siendo infectiva aún en suelos desprovistos del hospedante específico. También puede obtener recursos de la descomposición de la materia orgánica muerta (37).

#### 4.4. 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 hospedante mientras ésta proporciona compuestos carbonados al hongo. Hay dos tipos básicos de asociación: las ectomicorrizas y las endomicorrizas.

##### 4.4.1. Endomicorrizas

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 (38). Los simbiosntes más comunes son micromicetos de los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* y otros hongos, cuyo micelio forma una extensa red en el suelo alrededor de las raíces micorrizadas (39).



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 (40).

**Figura 4.3.** Endomicorriza vesículo-arbuscular (42)

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, aunque a veces resultan antagonistas de agentes de biocontrol como *Trichoderma harzianum* (41).

El hongo suministra nutrientes minerales al hospedante, 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 (43). 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 (44).

Hay otros tipos de endomicorrizas como las que forman ovillos intracelulares de un asco o basidiomiceto. En general, cada una de las diferentes especies vegetales tienen una alta especificidad por un simbionte particular. En algunos casos, como las orquídeas, el grado de interdependencia entre los asociados suele ser tal que la planta no se puede cultivar sin el hongo (45).

#### 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

El lactofenol contiene: ácido láctico 100 ml, fenol 20 g, glicerol 50 mL, agua 40 ml. 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 (39).

#### 4.4.2. Ectomicorrizas

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 (46). Las especies fúngicas implicadas son macromicetos que solamente estando en simbiosis pueden formar basidiomas, tal el caso de *Amanita*, *Boletus*, *Lactarius*, *Pisolithus* y *Suillus*, o ascomas como *Tuber*. Es poca la especificidad de estas asociaciones (45).

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.

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<sub>2</sub> 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 la incorporación de compuestos nitrogenados a considerables distancias del manto o movilizándolo desde el mantillo en un suelo forestal (46).

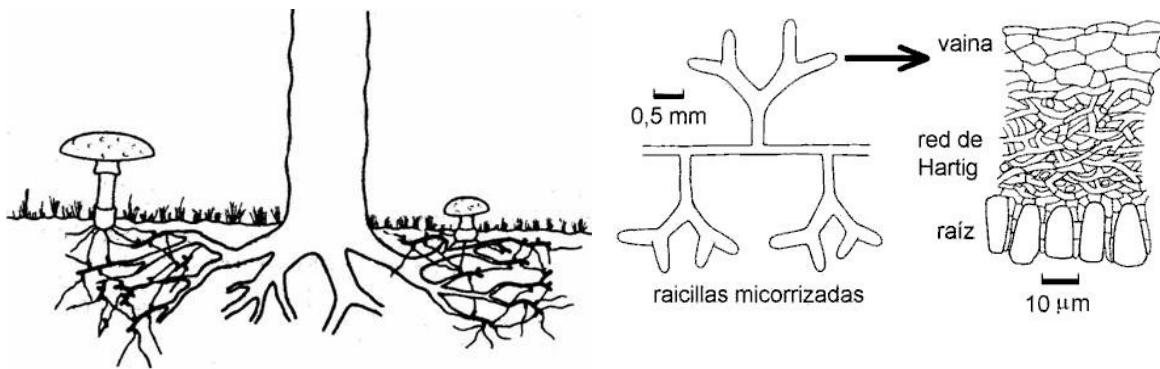


Figura 4.4. Izquierda: macromicetos micorrizantes. Derecha: micorrizas en pino (45)

#### Obtención de hongos endótrofos

Mezclar 50 g de suelo con 1 L de agua, agitar intensamente, dejar decantar 30 segundos y pasar sucesivamente por una serie de tamices cuya malla tiene aberturas de 700, 250 y 100 µm. En este último quedarán retenidas la mayoría de las esporas.

Se resuspenden en poca cantidad de agua y se colocan en una maceta a unos 2-3 cm por debajo de las semillas de *Allium cepa* u otras.

El sustrato es una mezcla de suelo y arena (2+1) de pH ligeramente ácido. Luego de 12-15 semanas se extraen las raíces colonizadas (47).

Algunos hongos micorrícicos estimulan el crecimiento de los vegetales o producen antibióticos, contribuyendo a regular el microambiente alrededor de las raíces y prevenir la infección de las plantas. Pero a pesar de los beneficios que ciertos hongos confieren a determinados hospedantes, pueden llegar a causar un daño considerable en otras plantas.

En general los hongos ectomicorrícicos deben incorporarse a las plántulas de árboles y plantas ornamentales, cuando se desarrollan en medios artificiales con vermiculita o arena. La falta de micorrización acarrea problemas en el transplante, excepto en los casos en que el suelo contenga especies fúngicas.

Las primeras técnicas de inoculación consistían en el transporte de suelo desde la zona de origen de la plantación al vivero, pero se corría el riesgo de llevar también microorganismos patógenos. Para inocular con cultivos puros, el sustrato (suelo, turba) debe ser previamente pasterizado o fumigado con el fin de disminuir la población fúngica nativa que podría competir con el inóculo.

Los hongos pueden ser incorporados al sustrato con pedazos de ascoma o basidioma, trozos de raíces micorrizadas, o micelio obtenido in vitro. El agregado de micelio es conveniente en el caso de hongos que se desarrollan bien en cultivo. El primer paso de toda inoculación consiste en la selección del hongo, los siguientes obtener el cultivo y multiplicarlo para añadirlo al suelo donde se coloca la plántula crecida en condiciones axénicas. La micorrización de pinos puede hacerse con especies comestibles de *Boletus* o *Lactarius*, pero *Pisolithus tinctorius* permite implantarlos en suelos muy erosionados, pobres en materia orgánica y nutrientes minerales (45).

### Inoculación de ectomicorrizas

Cortar el basidioma con un instrumento previamente mojado en alcohol y encendido. Con un gancho o pinza estéril tomar porciones del interior del sombrero y depositarlas sobre la superficie de una placa de agar malta levadura. Incubar a 25-27°C, dos o más semanas en la oscuridad.

Repicar en 50 ml de medio líquido de Melin Norkrins modificado en un matraz de Erlenmeyer de 250 mL e incubar a 25-27°C con una agitación de 100 rpm y en la oscuridad, el tiempo requerido para un buen crecimiento.

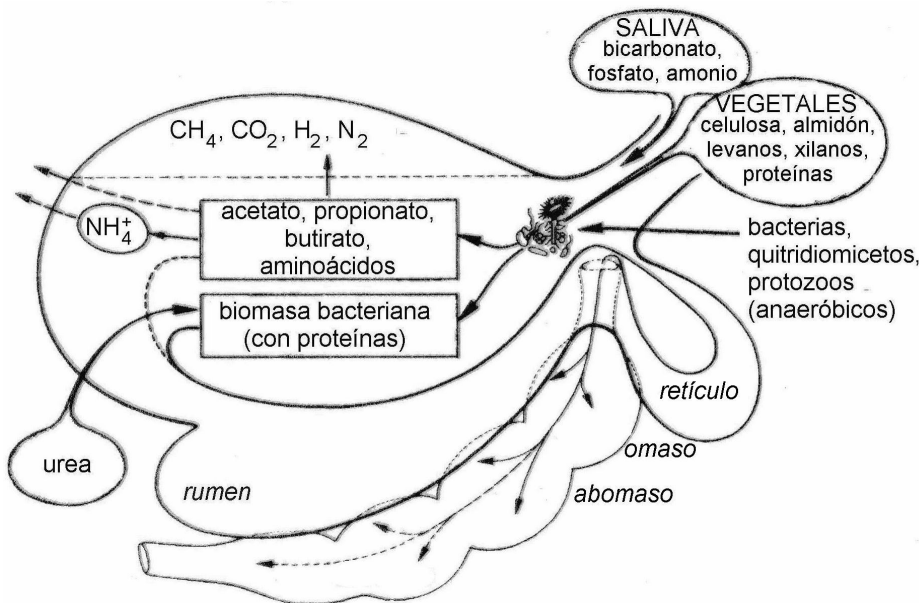
Homoginizar el cultivo, mezclar con el sustrato pasteurizado previamente con vapor de agua a 60°C durante 1 hora. Llenar unas macetas pequeñas y colocar los plantines. Llevarlos al invernáculo.

El agar malta levadura contiene: extracto de malta 20 g, extracto de levadura 2 g, agar 20 g, agua 1 L. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

El medio líquido de Melin Norkrins modificado contiene cloruro de calcio 0,05 g, cloruro de sodio 0,025 g, fosfato monopotásico 0,5 g, fosfato diamónico 0,25 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,15 g, cloruro férrico (al 1% p/v) 1,2 mL, extracto de malta 1,5 g, sacarosa 10 g, agua 1 litro. Esterilizar a 110°C durante 20 minutos (47).

## 4.5. Rumen

La digestión en el rumen es un caso de mutualismo entre animales y microorganismos. Los rumiantes son mamíferos herbívoros que poseen un órgano especial en cuyo interior se lleva a cabo, mediante la actividad microbiana, la digestión de la celulosa constituyente del forraje porque estos animales carecen de las enzimas necesarias para digerirla. El rumen tiene un tamaño relativamente grande con una temperatura entre 35 y 40°C y un pH de 6,5 a 7,0) en condiciones anóxicas (4).



**Figura 4.5.** Digestión anaeróbica en el rumen (4)

El forraje llega al rumen mezclado con la saliva que contiene bicarbonato y allí es sometido a un movimiento rotatorio durante el cual ocurren las

fermentaciones. Esta acción peristáltica facilita la adherencia bacteriana al material celulósico suspendido.

La masa de forraje pasa gradualmente al retículo donde se forman unas porciones llamadas rumias que regresan a la boca y son masticadas otra vez. Cuando esta masa sólida queda bien fragmentada es engullida de nuevo pero pasa directamente al omaso y termina en el abomaso, donde las condiciones son ácidas y allí se inicia un proceso digestivo que continua en el intestino. Muchas de las células microbianas formadas en el rumen son digeridas por la lisozima y otras enzimas, constituyendo la principal fuente de proteínas y vitaminas del animal, dado que la pastura es un alimento deficiente en tales compuestos (3).

El alimento permanece en el rumen de nueve a doce horas. El fluido ruminal contiene gran cantidad de organismos, de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  células/mL. Las bacterias y los hongos celulolíticos actúan produciendo celobiosa y glucosa. Los monómeros provenientes tanto de la celulolisis como de la degradación de otros polisacáridos son fermentados con formación de ácidos orgánicos (acético, propiónico y butírico), dióxido de carbono y metano. Los gases formados son eliminados al exterior por los eructos del animal.

Los ácidos grasos atraviesan la pared del rumen y pasan a la sangre, que los lleva a los tejidos donde son utilizados como la principal fuente de energía. Además los microbios sintetizan los aminoácidos y vitaminas esenciales para el animal, y hay una fijación de  $N_2$  del orden de 10 mg diarios por cabeza de ganado.

El contenido ruminal posee aproximadamente  $10^6$  protozoos/mL, la mayoría ciliados. Muchos son anaerobios obligados, una característica poco frecuente entre los organismos eucarióticos (7). Los protozoos ingieren bacterias, además de partículas vegetales, y ejercen algún control sobre densidad microbiana en el rumen. También hay hongos anaeróbicos como *Neocallimastix*, *Orpinomyces* y *Piromyces* (48).

Las condiciones ambientales del rumen son constantes para cada tipo de alimentación. El cambio brusco de pasturas a cereales conduce a un desequilibrio en la composición microbiana que causa enfermedad o aún la muerte del animal, por el crecimiento explosivo de *Streptococcus bovis* que hidroliza almidón produciendo abundante ácido láctico y acidificando el rumen. Esta acidosis causa la eliminación de la microbiota normal (49).

#### 4.6. Probióticos

Este término se utiliza para designar a las bacterias que tienen efectos beneficiosos para humanos y animales. Los probióticos afectan de manera beneficiosa al hospedante al mejorar las propiedades de la microflora intestinal indígena, se utilizan para prevenir las infecciones entéricas, gastrointestinales (50), también actúan sobre el sistema inmune aumentando tanto la respuesta inespecífica (fagocitosis, actividad de las células “natural killer”) como inespecíficas (producción de anticuerpos y citoquinas, proliferación de linfocitos) (51).

Los principales bacterias utilizadas en las fórmulas probióticas son *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* y *Streptococcus thermophilus*, también



bacterias esporuladas del género *Bacillus*. Además levaduras tales como *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (52, 53).

Los organismos probióticos, con el fin de ser considerados como tales, deben cumplir con uno o más de los siguientes criterios:

- identificación taxonómica segura,
- específicos de su huésped,
- no tóxicos,
- no patógenos,
- productores de sustancias antimicrobianas (ácido láctico u otro ácido graso de cadena corta, bacteriocinas, biosurfactantes)
- no deben poseer genes de virulencia o resistencia a los antibióticos (54).

Numerosos estudios se llevan a cabo actualmente sobre la aplicación de probióticos en la salud de aves de corral, ganado bovino, caprinos, porcinos, peces y abejas. Por otra parte, las innovaciones tecnológicas con probióticos de las industrias alimentaria y farmacéutica van desde la conservación de los alimentos a su utilización como complementos dietéticos (55).

---

## Referencias

1. Hurst J, ed. Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington, 1997
2. Greenberg EP. ASM News 63: 371, 1997
3. Madigan TM *et al.* Brock-Biology of Microorganisms. 10° ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2003
4. Schlegel HG. General Microbiology. University Press, Cambridge, 1993
5. Fenchel T *et al.* Bacterial Biogeochemistry. 2° ed, Academic Press, San Diego, 2000
6. Costerton JW, Stewart PS. Investigación y Ciencia 300: 55, 2001
7. Atlas RM, Bartha R. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4° ed. Addison Wesley, Madrid, 2002
8. Doyle MP *et al.*, editores. Food Microbiology. ASM Press, Washington, 1997
9. Kavanagh K, editor. Fungi: Biology and Applications. 2° ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 2011
10. Chapela IH *et al.* Science 266: 1691, 1994
11. Hölldobler B, Wilson EO. The Ants. Cambridge, Harvard University Press. 1990
12. Ribeiro Neto JD *et al.* Entomologia Experimentalis et Applicata 144: 209, 2012
13. Herrera CM, Pellmyr O, eds. Plant-Animal Interaction. Blackwell Publishing, Oxford, 2002
14. Bononi VLR *et al.* Rickia 9: 93, 1981
15. Voglmayr H *et al.* Fungal Biology 115: 1077, 2011
16. Meyer ST *et al.* Ecological Entomology 36: 14, 2011
17. Martínez Romero E, Martínez Romero JC. Microbios en línea. CIFN, México, 2005  
<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios>
18. Bashan Y *et al.* Applied and Environmental Microbiology 61: 1938, 1995
19. Elbeltagy A *et al.* Applied and Environmental Microbiology 67 : 5285, 2001
20. Johanson PM, Wright SAI. Applied and Environmental Microbiology 69: 6464, 2003
21. Minamisawa K *et al.* Applied and Environmental Microbiology 70: 3096, 2004
22. Dommergues Y *et al.* Mundo Científico 45: 276, 1985
23. Estrada de los Santos P *et al.* 2001. Applied and Environmental Microbiology 67: 2790, 2001
24. Alef K, Nannipieri P, eds. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London, 1995
25. Chen WM *et al.* Journal of Bacteriology 185: 7266, 2003
26. Sy A *et al.* Journal of Bacteriology 183: 214, 2001
27. Perret X *et al.* Microbiological and Molecular Biology Reviews 64: 180, 2000
28. Van Rhijn P, Vanderleyden J. Microbiological Reviews 58: 124, 1995
29. Dommergues Y, Manganot F. Écologie Microbienne du Sol. Masson et Cie, Paris, 1970
30. Truchet G. *et al.* Mundo Científico 133: 267, 1993.
31. Haukka K *et al.* Applied and Environmental Microbiology 64: 419, 1998
32. Becana M. Investigación y Ciencia 221: 16, 1995
33. Patriarca EJ *et al.* Microbiological and Molecular Biology Reviews 66: 203, 2002.
34. Girard H, Rougieux R. Técnicas de Microbiología Agrícola. Acribia, Zaragoza, 1964,
35. Primrose SB, Wardlaw AC, editores. Sourcebook of Experiments for the Teaching of Microbiology. Academic Press, Orlando, Florida, 1982, p. 660
36. Balatti AP, Jardim Freire JR, eds. Legume Inoculants. Kingraf, La Plata, 1996
37. Nickel A *et al.* Applied and Environmental Microbiology 67: 2603, 2001
38. van Aarle IM, Olsson PA. Applied and Environmental Microbiology 69: 6762, 2003.

39. Hall GS, ed. *Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments*. CAB International, Wallingford, 1996
40. Hildebrandt U *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1919, 2002.
41. Green H *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1428, 1999.
42. Letacon F. *Mundo Científico* 49: 776, 1985.
43. Solaiman MZ *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5604, 1999.
44. Scheublin TR *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6240, 2004.
45. Hudson HJ. *Fungal Biology*. Edward Arnold, London, 1986.
46. Morel M *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 71: 382, 2005.
47. Jackson RM, Masson PA. *Mycorrhiza*. Edward Arnold, London, 1984.
48. Carlile MJ *et al.* *The Fungi*. 2° ed. Academic Press, San Diego, 2001
49. Smith WH *et al.*, eds. *Methane from biomass: a systems approach*. Elsevier, Barking, 1988
50. Gronlund M *et al.* *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. 83: F186, 2000.
51. Perdigon *et al.* *European Journal of Clinical Nutrition* 56 (Suppl 4): S21, 2002
52. Klaenhammer T, Kullen MJ. *International Journal of Food Microbiology* 50: 45. 1999.
53. Anadón A *et al.* *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45: 91, 2006.
54. Salminen S *et al.* *International of Journal Food Microbiology* 44: 93, 1998.
55. Ramos-Cormenzana A *et al.* *Probióticos y salud*. Díaz de Santos, Granada, 2012.